Vol. III, No. 3. **APRIL, 1924**

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

Torasaburo Araki, Kyoto; **Motonosuke Goto**, Fukuoka; **Kikunae Ikeda**, Tokyo
Katsuji Inouye, Sendai; **Toshiharu Iwano**, Hoten; **Motozo Kawakita**, Niigata;
Shigeru Komatsu, Kyoto; **Yashiro Kotake**, Osaka; **Kanaye Mayeda**, Kyoto;
Leonor Michaelis, Nagoya; **Koji Miyake**, Sapporo; **Takeyoshi Nagayama**, Tokyo;
Kaoru Oguro, Sapporo; **Yuzuru Okuda**, Fukuoka; **Takaoki Sasaki**, Tokyo;
Torai Shimamura, Tokyo; **Tayei Shimidzu**, Okayama; **Kenzo Suto**, Kanazawa;
Umetaro Suzuki, Tokyo; **Yutaka Teruuchi**, Tokyo; **Masaji Tomita**, Nagasaki;
Makoto Yamakawa, Tokyo; **Kiyohisa Yoshimura**, Kagoshima; **Hsien Wu**, Peking;

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI
Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO
THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY
11 Itchome Kagacho, Ushigome

Price { ¥ 10.00 per volume, Nippon
$ 5.50 per volume, other countries

ON THE NATURE OF THE ABSORPTION OF AMMONIA BY SOILS.

BY

KOJI MIYAKE, MICHITARO SUGAWARA AND KOJI NAKAMURA.

(From the Institute of Agricultural Chemistry, Hokkaido Imperial University, Sapporo.)

(Received for publication, July 29, 1923.)

INTRODUCTION.

All soils have the power of holding plant nutrients, though there is a great difference in the power according to the kind of soil and nutrient. This has been frequently and continuously observed from the time that T. Way undertook his investigation in 1850, and now we are able to accumulate a great amount of the experimental results on it (the bibliography on this subject was collected by J. A. Prescott in 1916).

On the nature of this power of holding plant nutrients, Way showed that the nutrient was held by a chemical reaction in a soil, while J. von Liebig (1858) criticized Way's hypothesis, stating that the absorption of plant nutrients by soils is a physical phenomenon. Since W. Knop (1868) attempted to combine Way's chemical and Liebig's physical hypotheses, it is believed in general that the absorption of the base from the solution by the soil with which the neutral solution is brought into contact, is a physical phenomenon, and the replacement of the soil base in the solution is a secondary chemical reaction.

It is quite difficult, however, to determine exactly whether the nature of the absorption is a physical or chemical phenomenon, because there is no method of knowing accurately either the chemical or physical constituents of the soil. Moreover, we can not observe the chemical activities of the soils only, for they can not be separated from its physical activities. In addition to this, there is little knowledge concerning the amounts and the properties of the colloid, which is considered to be the main acting substance relative to the absorption phenomena in the soil. If both chemical and physical phenomena take place in the absorption phenomenon, separate observation will be very difficult.

E. Ramman (1911) described some conditions in which chemical and a physical absorption will be influenced in opposite ways, the determining factors being time and temperature. The observation in such conditions is, therefore, the most powerful way left to us for the examination of the absorption phenomena either physical or chemical.

Then, we undertook the present investigation to determine in more detail than in the papers which have hitherto appeared, whether the nature of absorption of ammonia by soils is a physical or chemical phenomenon. Our experiment was, therefore, conducted under the following conditions :—

1) Under different concentration of the solution.
2) Under different time.
3) Under different temperature.
4) Under different salts of same cation.

The theoretical considerations are as follows :—

1) *Concentration.* If the absorption is chemical, it must obey the mass action law. But if it is physical absorption, the phenomenon must be explained by the following Freundlich's formula,

$$\frac{x}{m} = \alpha \, C^{1/n}$$

where $1/n$ is always smaller than 1. x is the amount of the substance absorbed by m gm. of the soil in the solution, its concentration is C, α and $1/n$ are the constants concerning temperature and time duration and they depend upon the kind of soil.

The formula can be developed as follows:—

$$\log \frac{x}{m} = \log \alpha + 1/n \log C.$$

2) *Time.* There is equilibrium in the absorption, and it must be reached in a short time if the absorption is physical, while the equilibrium of a chemical reaction is reached after a long time. And if the absorption is physical, it must follow the ordinary time rate for the diffusion of liquid into absorbing substances, viz:—

$$x = kt^{m}$$

where x is the amount absorbed, t is the time, k and m are constants which depend upon the concentration and the kind of soil and solution used. The formula can be developed as follows:—

$$\log x = \log k + m \log t$$

3) *Temperature.* If absorption is a chemical reaction between the absorbent and the solution, and is an endothermal reaction, the reaction must be hastened by the rising of the temperature. Physical absorption, on the contrary, is an exothermal change, and the rising of the temperature makes the action slow.

4) *Kind of salt solutions.* Soil generally absorbs more cation than anion from the salt solutions. There are two explanations for this absorption, from the chemical and physical standpoints, as follows:—

i) Chemical standpoint. In general, the following exchange occurs between two cations in the soil and the solution.

$$\underbrace{X{\cdot}A}_{\text{solution}} + \underbrace{X'\text{-silicate}}_{\text{soil}} = \underbrace{X'{\cdot}A}_{\substack{\text{soluble}\\ \text{(replaced)}}} + \underbrace{X\text{-silicate}}_{\substack{\text{insoluble}\\ \text{(absorbed)}}}$$

The equivalent relation is held between lost X and resultant

X′ and if there is a difference between them, there must be found free acid, corresponding to the difference which is produced in the following reaction.

$$\text{X·A} + \text{H-silicate} = \text{H·A} + \text{X-silicate.}$$

ii) Physical standpoint. Salt undergoes hydrolysis in its solution as follows :—

$$\text{X·A} + \text{H}_2\text{O} = \text{H·A} + \text{X·OH}$$

where X-OH is absorbed. So the loss of X from the solution is quite independent of the replacement of X′, which moves over from the soil to the solution as the secondary reaction, i. e. by the solvent action of free acid which is produced as the result of basic absorption.

In chemical absorption, the chemical affinity of cations to different anions determines the amount of the substance in this reaction, while in physical absorption the different anions produce free acids of different strength, and the cation associated with weak acid must be more absorbed than the other, for the salt of weak acid is more hydrolysed than that of the strong acid, and less surface energy is required to obtain the cations from the solution. The quantity of anions combined with the soil bases depends on the specific property of the anions. In this case, weak acid dissolves a small amount of base from the soil and, correspondingly, a strong acidity will be produced in the resultant solution.

Above all, if the absorption phenomenon is physical, and X-OH is absorbed by the soil, the replacement of the soil base in the solution will be a chemical secondary reaction. Therefore, the amount of the soil base in the solution will be increased according to the increase of the concentration of the solution, to the time duration and to the rising of the temperature.

The soil which we used in this experiment was a loamy clay soil taken from our university experimental field. After it had been dried in the open air, it was strained by a 0.5 mm. sieve, before being used.

EXPERIMENTS.

Effect of concentration.

Eleven ammonium chloride solutions of different concentration were prepared and their concentration was determined by the amount of ammonia in them. Ammonia nitrogen was determined by a magnesium oxide method. 300 cc. of this solution was taken in an Erlenmeyer flask of 500 cc. volume with 50 gm. of soil, and the flask was shaken for 3 minutes and was held for 24 hours at 30°C in the incubator. Then the supernatant liquid was filtered and the definite volume of each filtrate was treated by the magnesium oxide method. The results were as follows:—

TABLE I.

No. of solution	Concentration (normal)	NH_3 in 100 cc. of solution.		Difference (absorbed)	Percentage
		Before contact	After contact		
1	1	1.6081	1.5249	0.0832	5.17
2	1/2	0.8404	0.7637	0.0776	9.12
3	1/4	0.4168	0.3620	0.0549	13.2
4	1/8	0.2391	0.1930	0.0335	14.8
5	1/10	0.1688	0.1381	0.0307	18.1
6	1/25	0.0681	0.0471	0.0210	30.8
7	1/50	0.0315	0.0154	0.0161	51.1
8	1/75	0.0234	0.0097	0.0137	58.6
9	1/100	0.0153	0.0052	0.0101	66.0
10	1/200	0.0088	0.0016	0.0072	81.8
11	1/300	0.0064	0.0006	0.0058	92.1

In table I, the difference denotes the amount of ammonia which was absorbed from 100 cc. solution by 20 gm. of soils. The amount of ammonia absorbed by soil increased according to the rising of the concentration, approaching generally the maximum point. Its percentage, on the contrary, gradually increased according to the lowering of the concentration. As already described, if the loss of ammonia in the ammonium chloride solution was caused by physical absorption, the relation between the concentration of the solution used and the amount of ammonia adsorbed must obey Freundlich's formula. To determine this relation in our result, the concentration of ammonia in the solution was converted into the mole litre number and the amount of ammonia absorbed (x/m) was converted into 1/1000 mole number adsorbed by 1 gm. of soil, as follows :—

TABLE II.

No. of solution	Concentration	Amount of NH_3 absorbed
1	0.9440	0.2442
2	0.4933	0.2251
3	0.2448	0.1661
4	0.1404	0.1002
5	0.0991	0.0900
6	0.0399	0.0725
7	0.0184	0.0472
8	0.0134	0.0402
9	0.0089	0.0296
10	0.0051	0.0211
11	0.0037	0.0170

These values were substituted in the equation

$$\log \frac{x}{m} = \log a + 1/n \log C.$$

Then we calculated a and $1/n$ by least square and found

$$1/n = 0.3245$$
$$a = 0.1800.$$

x/m was calculated by the substitution of these two constants in the equation and the values calculated were compared with those values actually found in the experiment.

TABLE III.

No. of solution	C	x/m	
		Found	Calculated
1	0.9440	0.2442	0.1791
2	0.4933	0.2251	0.1431
3	0.2448	0.1061	0.1140
4	0.1404	0.1002	0.0909
5	0.0991	0.0900	0.0850
6	0.0399	0.0725	0.0634
7	0.0184	0.0472	0.0492
8	0.0134	0.0402	0.0444
9	0.0089	0.0296	0.0389
10	0.0051	0.0211	0.0325
11	0.0037	0.0170	0.0293

The experimental values of x/m quite resemble the calculated values, although there was a distinct difference between these two values in the solution of higher concentration, yet as was already proved by G. C. Schmidt (1910) and other investigators on the pure adsorption of colloid, Freundlich's absorption formula could not be adopted to denote the phenomena when the concentration of the solution was high. Of course, it is too early to conclude that the absorption of ammonia by soil is physical by only one such series of results, but it is suggested from this result that ammonia is adsorbed by the soil according to the Freundlich's formula.

It was necessary, therefore, to examine the replaced substance in the solution after it was placed in contact with the soil, if we wish to ascertain more fully the nature of ammonia absorption. For this object, two litres each of some of the above solution were put into contact with 400 gm. of the soil and treated by the same process as already described. One litre of the supernatant liquid was taken and analysed by the usual method of analysis. The results were calculated in gm. in 100 cc. of the original solution and then, for the convenience of comparison, these figures were converted into the equivalent weight of ammonium chloride as will be shown in table IV.

TABLE IV.

The equivalent weight of NH_4Cl for replaced substances in the resultant solution.

(gm. in 100 cc. of the solution.)

No. of solution / Substance	5	6	7	8	9
Fe_2O_3	0.0005	0.0003	0.0002	0.0001	0.0001
Al_2O_3	0.0058	0.0044	0.0035	0.0027	0.0016
Mn_2O_3	0.0032	0.0039	0.0015	0.0044	0.0042
CaO	0.0494	0.0260	0.0179	0.0103	0.0088
MgO	0.0249	0·0198	0.0158	0.0138	0.0071
KCl	0.0020	0.0057	0.0032	0.0044	0.0023
NaCl	0.0016	0.0021	0.0031	0.0023	0.0033
Total	0.0874	0.0622	0.0452	0.0380	0.0274

The amount of ammonia absorbed by the soil was converted into the equivalent weight of ammonium chloride and these amounts were compared with those of the total substance replaced.

	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9
NH_3 absorbed.	0.0963	0.0659	0.0505	0.0430	0.0317
Total substance replaced.	0.0874	0.0622	0.0452	0.0380	0.0274
Difference.	0.0089	0.0037	0.0053	0.0050	0.0043

The acidity of the resultant solution was then determined. 100 cc. of each resultant solution was taken and titrated by 1/100 normal sodium hydroxide solution after freeing CO_2 by heating, using phenolphthaleine as indicator. These results were calculated as equivalent weight of ammonium chloride in 100 cc. of resultant solution, and compared with the difference between ammonia absorbed and total substances replaced, as follows :—

	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9
Difference of the amount of absorbed and replaced.	0.0089	0.0037	0.0053	0.0050	0.0043
Acidity in resultant solution.	0.0112	0.0051	0.0066	0.0061	0.0052
Difference.	0.0023	0·0014	0.0013	0.0009	0.0009

If the absorption is chemical, the exchange of base will take place in the course of the reaction, and the amount of ammonia absorbed by the soil will agree with the total amount of substances replaced according to the theory of mass action. The difference between the amount of ammonia absorbed and the total amount of the substance replaced is not, therefore, easily understood.

There is only one way of explaining their chemical reaction, namely, that an exchange between the ammonium chloride in the solution and the hydrogen of the H-silicate in the soil occurred, producing free HCl in the resultant solution, and this caused the difference between the amount of ammonia absorbed and the total amount of the substances replaced. This explanation has been proposed by R. H. Robinson (1921) but was not positively proved with regard to an ammonium chloride solution.

These difficulties are easily solved by the physical explanation. As ammonium chloride is a salt of strong acid and weak base, it is hydrolysed in the solution. The ammonium hydroxide in the solution exists almost in unionized form, while the resultant hydrochloric acid is dissociated to a large degree, and makes the reaction of the solution acidic. This unionized ammonium hydroxide in the solution is absorbed when the solution is brought into a contact with the soil and the resultant hydrochloric acid acts on the soil particles and dissolves the base in the solution as a secondary reaction. There is no direct quantitative relation, therefore, between the loss of ammonia and replacement of bases in the solution.

The difference between the amount of the ammonia absorbed and the amount of the substances replaced is easily explained by the fact that the acidity of the resultant solution quite resembles that difference. This fact has been already experienced by E. H. Parker (1914). Against this, those who claimed the theory of chemical exchange, tried to explain that the acidity of the resultant solution was caused by an acidic compound, such as aluminium chloride and iron chloride, and they had a good many experimental proofs. But, in our experiment, there is no agreement between the total amount of aluminium oxide and iron oxide in the resultant solution and its acidity. We can not, therefore, believe that the acidity was caused only by these substances, in the limit of time of our experiment.

There is nothing remarkable with regard to the bases which were dissolved out of the soil. The amount of each constituent of dissolved bases increased according to the rising of the concentration of the solution, and the total sum of each also increased. This fact was explained by basic exchange as well as by solvent action of the resultant hydrochloric acid, for both of them were chemical in nature.

Effect of time.

By the same process, the effect of time on this absorption was investigated. Two litres of 1/10 nomal ammonium chloride solution were placed in contact with 400 gm. of the soil, and shaken for 3 minutes and held at 30°C during a definite period of time, and then analysed. The results were as follows:—

TABLE V.

On basis of 100 cc. solution.

	gm. of NH_3 after contact	gm. of NH_3 absorbed	Percentage of NH_3 absorbed
Original solution	0.1567	—	—
After 3 minutes	0.1398	0.0169	10.77
After 5 minutes	0.1372	0.0195	12.43
After 10 minutes	0.1333	0.0234	14.91
After 15 minutes	0.1319	0.0248	15.81
After 20 minutes	0.1312	0.0255	16.25
After 25 minutes	0.1306	0.0261	16.63
After 30 minutes	0.1297	0.0270	17.21
After 60 minutes	0.1273	0.0294	18.74
After 3 hours	0.1273	0.0294	18.74
After 5 hours	0.1273	0.0294	18.74
After 15 hours	0.1273	0.0294	18.74
After 20 hours	0.1273	0.0294	18.74
After 24 hours	0.1273	0.0294	18.74

The loss of ammonia from the original solution attained the maximum after about half an hour. This fact supports the theory that ammonia absorption is a physical phenomenon, because rather a long time will be needed in chemical reaction until it reaches the maximum while in physical absorption the maximum is reached in a short time.

As mentioned already, if the absorption phenomenon is physical, its time relation shall be followed the equation :—

$$\ln x = \ln k + m \ln t.$$

In order to test the amount of ammonia absorbed it was converted into 1/1000 mole number absorbed by 1 gm. of soil, and the constants m and k were determined as follows :—

$$m = 0.2034$$

$$k = 0.39811$$

Thus the amount of ammonia absorbed which was found and calculated was compared as follows :—

TABLE VI.

Ammount of ammonia absorbed.

	Found	Calculated
After 3 minutes	0.4421	0.4978
After 5 minutes	0.5723	0.5524
After 10 minutes	0.6869	0.6359
After 15 minutes	0.7280	0.6907
After 20 minutes	0.7485	0.7321
After 25 minutes	0.7661	0.7661
After 30 minutes	0.7745	0.7950
After 60 minutes	0.8630	0.9156

The amount of ammonia absorbed which was found resembled the calculated value. This fact and other results obtained in our laboratory show that ammonia will be absorbed by the soil according to the equation of the ordinary time rate for the diffusion of liquids into absorbing substances.

One litre of the resultant solution was analysed and the results are shown in table VI, where they are shown in equivalent weight of ammonium chloride.

TABLE VII.

The equivalent weight of NH_4Cl for replaced substances in the resultant solution.

(gm. in 100 cc. of the solution.)

Time / Substance	3 m.	½ h.	1 h.	3 h.	5 h.	15 h.	20 h.	24 h.
Fe_2O_3	0.0032	0.0025	0.0028	0.0014	0.0012	0.0017	0.0013	0.0006
Al_2O_3	0.0278	0.0349	0.0425	0.0550	0.0521	0.0060	0.0061	0.0055
Mn_2O_3	0.0016	0.0019	0.0013	0.0018	0.0029	0.0045	0.0032	0.0023
CaO	0.0022	0.0070	0.0072	0.0046	0.0090	0.0353	0.0451	0.0454
MgO	0.0096	0.0282	0.0188	0.0144	0.0157	0.0274	0.0249	0.0251
KCl	0.0003	0.0005	0.0009	0.0006	0.0012	0.0018	0.0021	0.0023
NaCl	0.0015	0.0024	0.0014	0.0015	0.0011	0.0016	0.0012	0.0014
Total	0.0462	0.0774	0.0749	0.0793	0.0832	0.0783	0.0839	0.0826
NH_3 absorbed	0.0531	0.0848	0.0925	0.0926	0.0926	0.0926	0.0926	0.0926
Difference	0.0069	0.0074	0.0176	0.0133	0.0094	0.0143	0.0087	0.0100
Acidity	0.0071	0.0080	0.0182	0.0141	0.0100	0.0151	0.0109	0.0111
Difference	0.0003	0.0006	0.0006	0.0008	0.0006	0.0008	0.0022	0.0011

The amount of the bases replaced was gradually increased according to the lapse of time, though the amount of ammonia absorbed by the soil reached the maximum after approximately half an hour. This fact again gives the chemical explanation a severe contradiction, but, on the contrary, it gives great support to the physical explanation, for in basic exchange, there could be no increase in the amount of the substances replaced, after the amount of ammonia absorbed reached the maximum.

Moreover, there is a remarkable relation between the amount of bases replaced which could be easily understood from the physical standpoint. The large amount of aluminium appeared in the solution after 3 minutes of contact, while calcium and magnesium dissolved out only a small amount in the same length of time. But after 15, 20 and 24 hours, the result became quite contrary. These facts will be understood only by the separate consideration of the phenomena of the absorption and the basic dissolution. Ammonium chloride at first is hydrolysed in the solution as follows :—

$$NH_4Cl + H_2O = NH_4OH + HCl.$$

The resultant ammonium hydroxide is absorbed by the soil particles, while the HCl dissolves the bases of the soil.

At first aluminium and iron are more rapidly dissolved out than calcium and magnesium by HCl, and their amount gradually increases according to the increasing of the resultant HCl, while the amount of ammonium chloride decreases on account of the absorption of ammonium hydroxide at the same time. After dissolution of aluminium and iron as chloride, they undergo hydrolysis and form aluminium hydroxide and iron hydroxide in a sol state in the solusion. However, the amount of magnesium and calcium increases in the solution gradually, and their existence changes aluminium and iron hydroxide from sol to gel in the solution, and puts them outside of the solution. Thus the amount of aluminium and iron in the solution decreases after long contact. The HCl, which is the result of hydrolysis of aluminium and iron salts, will, then, be liberated and will dissolve the aluminium and iron, calcium and magnesium again, but the aluminium and iron salts undergo hydrolysis and will be changed from sol to gel in the same manner. Therefore, the amount of aluminium and iron does not increase.

Effect of temperature.

Two litres of 1/10 normal ammonium chloride solution were placed in contact with 400 gm. of the soil and shaken for 3 minutes and kept in constant temperature for half an hour in a water bath of constant temperature. Then the supernatant solution was taken and its ammonia nitrogen was determined and converted to ammonia as follows :—

TABLE VIII.

On basis of 100 cc. solution.

	gm. of NH_3 after contact	gm. of NH_3 absorbed	Percentage of NH_3 absorbed	gm. NH_4Cl equivalent to NH_3 absorbed
Original solution	0.1478	—	—	—
Solution kept at 10°C	0.1001	0.0477	32.3	0.1501
Solution kept at 20°C	0.1058	0.0420	28.5	0.1319
Solution kept at 30°C	0.1208	0.0270	18.3	0.0851

The amount of ammonia absorbed in the solution increased according to the depression of temperature. If the phenomenon is chemical, it should be accelerated by the rising of the temperature, but in this actual result, it is quite the contrary. This is easily understood when one keeps in mind that ammonia is absorbed physically by soils. According to the rising of the temperature, the surface energy of the solution decreases and the absorbed amount decreases also, as absorption is an exothermal reaction.

Next, one litre of the resultant solution was analysed. The results are shown in the following table :—

TABLE IX.

The equivalent weight of NH_4Cl for replaced substances in the resultant solution.

(gm. in 100 cc. of the solution.)

Temperature Substance	10°C.	20°C.	30°C.
Fe_2O_3	0.0032	0.0026	0.0024
Al_2O_3	0.0149	0.0150	0.0315

Temperature / Substance	10°C.	20°C.	30°C.
Mn_2O_3	0.0035	0.0028	0.0019
CaO	0.0061	0.0075	0.0070
MgO	0.0124	0.0196	0.0282
KCl	0.0005	0.0006	0.0005
NaCl	0.0018	0.0015	0.0014
Total	0.0424	0.0496	0.0729
NH_3 absorbed	0.1591	0.1319	0.0851
Difference	0.1167	0.0823	0.0122
Acidity	0.0980	0.0902	0.0120
Difference	0.0187	0.0079	0.0002

At a low temperature, a small amount of the base is dissolved out in the solution, while a large amount of ammonia is absorbed. There is a great difference between the amount of total bases dissolved and the amount of the ammonia absorbed, which is practically the same as the acidity of the resultant solution. This fact is also easily understood if the replacement of bases is considered separately from the absorption of ammonia in the solution.

The secondary reaction of the resultant HCl, in which the bases of the soil are replaced in the solution, is accelerated by the rising of the temperature, as it is a chemical endothermal reaction. Therefore, it is quite reasonable to say that the replaced base in the resultant solution was caused by the dissolving power of HCl.

Effect of anions in the salt.

Ammonium chloride, ammonium sulphate, ammonium acetate and ammonium carbonate were used for this experiment. 1/10 normal solution of each salt was prepared and two litres of them were mixed with 400 gm. of the soil, and held at 30°C for 24 hours, after shaking 3 minutes. The supernatant solution was analysed and the amount of ammonia absorbed was calculated as follows :—

TABLE X.

On basis of 100 cc. solution.

Solution	gm. of NH_3 before contact	gm. of NH_3 after contact	gm. of NH_3 absorbed	Percentage of NH_3 absorbed
NH_4Cl	0.1688	0.1381	0.0307	18.1
$(NH_4)_2SO_4$	0.1788	0.1488	0.0300	16.8
$(NH_4)C_2H_3O_2$	0.1798	0.1426	0.0372	20.7
$(NH_4)_2CO_3$	0.1789	0.1364	0.0425	23.7

The result shows that different anion influenced differently the amount of ammonia absorbed by the soil, the difference being especially noticeable between strong and weak acid radicals. More ammonia is absorbed when combined with weak acid than when combined with strong acid. If the absorption of ammonia is a chemical ionic reaction, ammonium chloride or ammonium sulphate should be more ionized than ammonium acetate or ammonium carbonate, and the reaction must occur more rapidly in the former salts than in the latter, when they are brought in contact with the soil. The results of the experiment, however, are against this expectation. It is easily understood if we considered this as physical absorption, in which ammonia absorbed directly by the soil in the form of ammonium hydroxide which is produced by hydrolysis of salt in the solution because the salt of weak acid is more hydrolysed than that of strong acid, and less surface energy is required to absorb ammonia from the solution of the former than of the latter salt.

Next, one litre of the resultant solution was analysed for determination of dissolved bases and the results were collected in table XI.

TABLE XI.

The equivalent weight of NH_4Cl for replaced substances in the resultant solution.

(gm. in 100 cc. of the solution.)

Substance	NH_4Cl	$(NH_4)_2SO_4$	$(NH_4)C_2H_3O_2$	$(NH_4)_2CO_3$
Fe_2O_3	0.0005	0.0003	0.0001	0.0001
Al_2O_3	0.0058	0.0043	0.0007	0.0003
Mn_2O_3	0.0032	0.0013	0.0001	trace
CaO	0.0494	0.0512	0·0446	0.0537
MgO	0·0249	0.0252	0.0203	0.0286
KCl	0.0020	0.0018	0.0011	0.0009
NaCl	0.0016	0.0016	0.0002	0.0008
Total	0.0874	0.0857	0.0671	0.0844
NH_3 absorbed	0.0963	0.0890	0.1108	0.1775
Difference	0.0089	0.0033	0.0437	0.0931
Acidity	0.0112	0.0052	0.0456	0.0947
Difference	0.0023	0.0019	0.0019	0.0016

The amount of bases dissolved out in the solution of ammonium acetate or ammonium carbonate is smaller than that of the others. This fact is explained by the strength of the acid, that is, the weak acid, remains in the solution after ammonia is absorbed, reacts on the soil bases a little, and dissolves a smaller amount of bases from it than the strong acid. Thus, the solution of the salt of weak acid produces, after contact with the soil, the solution in which a smaller amount of ammonia and other bases is contained, and there is greater acidity than in the strong acid salt solution.

Comparison with HCl extract of the soil.

In the former experiment, it was proved that the ammonia was absorbed physically by the soil at first, then the resultant HCl dissolved the soil bases chemically as a secondary reaction, when the soil was treated with ammonium chloride solution. To confirm this fact more exactly, the following observations were made.

When the ammonium chloride solution is brought into contact with the soil, ammonia will be absorbed in the form of ammonium hydroxide, and acid radical will be liberated in the form of HCl. When 1/10 normal ammonium chloride solution (its ammonia was estimated as 0.1650 gm. in 100 cc.) was added to the soil, the amount of ammonia absorbed has been indicated in the following table. Therefore, we calculated the amount of HCl which will be liberated by the absorption of ammonia from these amounts of ammonia absorbed, and the amount of NaOH which is required to neutralize the HCl is calculated as follows :—

TABLE XII.

gm. in 100 cc. of ammonium chloride solution.

Time	NH_3 absorbed	HCl liberated	NaOH to neutralize HCl
After 3 minutes	0.0178	0.038049	0.041854
After 5 minutes	0.0254	0.054356	0.059792
After 10 minutes	0.0260	0.055640	0.061204
After 15 minutes	0.0272	0.058208	0.064204
After 20 minutes	0.0301	0.064414	0.070848
After 25 minutes	0.0307	0.065698	0.072260
After 30 minutes	0.0309	0.066126	0.072730
After 60 minutes	0.03095	0.066340	0.072965
After 3 hours	0.03095	0.066340	0.072965

If we treat the soil with HCl in which the amount of HCl increases gradually according to the above table, the amount of bases which dissolve in this HCl solution will perhaps agree with the amount of bases replaced in 1/10 normal ammonium chloride solution. And if we treat the soil with 1/10 normal ammonium chloride solution, the amount of HCl which will be liberated according to the absorption of ammonia being neutralized by the NaOH solution as indicated in the above table, the amount of bases dissolved in the solution will agree with the amount of bases dissolved out in the water.

On this hypothesis, the following experiment was done. 400 gm. of the soil were treated with two litres of HCl solution, in which the amount of HCl was gradually increased according to the amount of HCl in the above table, and its amount was finally brought into 0.066340 gm. in 100 cc. of the solution. It was then held at 30°C in the the incubator for 24 hours. On the other hand, 400 gm. of the soil were treated with two litres of 1/10 normal ammonium chloride solution, and after being shaken for 3 minutes, it was held at 30°C for 24 hours in the incubator neutralizing its free HCl with NaOH gradually according to the amount of HCl in the above table. Then the supernatant solution was taken and analysed. The results obtained are compared in the following table with the results obtained when 1/10 normal ammonium chloride and water was used respectively.

TABLE XIII.

gm. in 100 cc. solution.

Substance	NH_4Cl	HCl	NH_4Cl neutralized by NaOH	Water
Fe_2O_3	0.00024	0.00030	0.00015	0.00015
Al_2O_3	0.00184	0.00230	0.00015	0.00014
Mn_2O_3	0.00157	0.00179	0.00013	0.00011
CaO	0.02628	0.02850	0.00023	0.00045
MgO	0.01170	0.01167	0.00008	0.00009
KCl	0.00278	0.00373	0.00017	0.00018
NaCl	0.00175	0.00156	(0.08940)	0.00011

From the above table, it is clear that the remarkable difference was not observed between the result which was gained in the case of the ammonium chloride solution and the HCl solution, or between the result of the water and that of ammonium chloride solution neutralized with NaOH. Judging from the result, we conclude that the absorption of ammonia by soils from the ammonium chloride solution was not a chemical process but a physical absorption, and the dissolving of the soil bases was a secondary chemical action.

SUMMARY.

A study of the nature of the absorption phenomenon of ammonia by the soil is done, and the results obtained are summarized as follows :—

1. The relation between the amount of ammonia absorbed and the concentration of ammonium chloride solution was demonstrated quite clearly by Freundlich's absorption formula.

2. The absorbing phenomena of ammonia by the soil reached the maximum in about half an hour. The effect of the time upon the absorption of ammonia was clearly demonstrated by the equation of the ordinary time rate for the diffusion of liquids into absorbing substances.

3. The depression of temperature increased the amount of ammounia absorbed.

4. The absorption phenomenon of ammonia from the ammonium chloride solution by the soils was a physical absorption, and the replacement of the soil base in the solution was a secondary chemical reaction. The latter reaction was carried out by the acid which was liberated as the result of the absorption of the base from the solution.

REFERENCES.

Hissink, D. J. (1919): Chem. Weekblad., **16**, 1128–1146.
Kelley, W. R. and Cumins, A. B. (1921): Soil Scie., **12**, 261–285.
Knop, W. (1868): Lehrbuch der Agri., Leipzig.
Liebig, J. V. (1858): Ann. Chem. Pharm., **105**, 109; **106**, 185.
Parker, E. G. (1913): Jour. Agri. Res., **1**, 179–188.
Prescott, J. A. (1916): Jour. Agri. Scie , **8**, 111–130.
Ramman, E. (1911): Bodenkunde.
Robinson, R. H. (1921): Soil Scie., **11**, 353–362.
Schmidt, G. C. (1910): Zeits. phys. Chem., **74**, 689.
Way, T. (1850): Jour. Roy. Agri. Soci., **11**, 313.
Wolkoff, M. I. (1917): Soil Scie., **3**, 561–564.

ON THE NATURE OF THE ACIDITY APPEARING AFTER THE ADDITION OF SOYBEAN CAKE TO A RICE FIELD.

BY

KOJI MIYAKE AND ISHIO TAMACHI.
(*From the Institute of Agricultural Chemistry, Hokkaido Imperial University, Sapporo.*)

(Received for publication, July 29, 1923.)

There is an important relation between the growth of plants and soil reaction. It is said that plants make a marked growth in a neutral medium. Then the effect of decomposing organic manure on the soil reaction can not be overlooked. Many papers have been written, up to the present time, by Miller (1917), Potter and Snyder (1917), Russell and Appleyard (1921), Skinner and Beattie (1917), White (1918), Hibbared (1919), and Stephenson (1921) about the effect of decay of organic manure on soil reaction, but only a few papers by Takaishi (1909), Tazaki and Imai (1909), Ishiwatari (1914) and Onodera (1918, 1919) have appeared concerning the same subject in the case of rice fields. The first four authors found that when soybean cake was put into rice field, it gradually decomposed giving acid reaction in water, and thus the organic acid produced by the decomposition may be the cause of acid reaction in water and of its toxic action upon plant growth. The last named author mentioned that the organic acids were produced by the decomposition of soybean cake but they were not so much concerned with acid reaction of water and exerted, consequently, no unfavorable influence on the growth of plants.

The decomposition of organic matter in soils is generally a biological process, and there are many products of decomposition such as organic acids, carbondioxide, nitric acid, ammonia etc. The organic acids, carbondioxide and nitric acid thus produced dissolve out in the soil water, and hasten the mineral disintegration of soils bringing mineral substance into the soil water. It may be expected, therefore, that as the decomposition of organic manure proceeds, the water of the soil becomes acid in some stage of decomposition. But it seems that the acidity manifested by the soil water is not due only to the free organic acid, but also to some of the soluble mineral substances in it, because mineral acids dissolved out from the soil and manure act as true acid if present in free state. Moreover, soluble salts of mineral and organic acids such as aluminium which is chemically neutral, give a decidedly acid reaction in water and denote a considerable amount of acidity producing a precipitate by the addition of alkali. The amount of alkali used for titration of acidity of soil water, therefore not only denote the true acidity of it, but also the amount of alkali needed for the precipitation of some of the mineral matters contained in it as insoluble hydrates.

If toxic action takes place in the growth of plant in the process of the decomposition of organic manure, it is considered that the action is not only due to the free organic acid present in soil water, but is also due to the presence of the some mineral matters, as aluminium, which is decidedly toxic to the plant growth. Especially, in modern investigations, the toxic action of soluble aluminium compounds is proved to be not overlooked with regard to the injurious effect of acid soil and soil water.

Since soybean cake is widely used in our agriculture and occupies an important position among the organic manures used in Japan, it is of much interest to study, more in detail, the nature of the acidity appearing in soil solution after the application of soybean cake to the rice field.

EXPERIMENT.

In this experiment, loamy soil which was taken from an unmanured plot of the experimental field of our college was used. Both soil and soybean cake were dried in the air and sifted through the sieve with 1 mm. mesh. 200 gm. soil and 10 gm. soybean cake were mixed in 300 cc. flask. After addition of 200 cc. of distilled water which resembled the condition of rice field, the flask was corked with cotton. Many flasks were treated in the same way, and in each stage of decomposition soil solution was made by shaking the soil manure mixture in flask with 800 cc. of distilled water for 3 minutes and by filtering through the Nutzer's filter. Total period given for decomposition was 60 days, and samples were taken at intervals of 10 days. The clear solution prepared from several flask was mixed together and then was used for analysis.

At the first the experiment was started for the purpose of investigating the development of acidity of soil solution in the process of the decay of soybean cake. The acidity of soil solution determined by the sample taken in each stage of decomposition is shown in Table I. The number of the table is denoted by cc. of N/100 HaOH used for neutralization, using phenolphtalein as indicator.

TABLE I.

The acidity of the soil solution.

Duration of decomposition	N/100 NaOH per 100 gm. soil	Duration of decomposition	N/100 NaOH per 100 gm. soil
days	*cc.*	*days*	*cc.*
10	74.5	40	300.0
20	117.5	50	388.0
30	225.0	60	375.0

The acidity of the soil solution increased to 50 days, then decreased as shown in the above table. It is reported by Ishiwatari (1914) that when the decomposition was continued, the reaction of soil solution changed finally from acid into alkaline. In our experiment we did not observe any alkali reaction through the whole period of the decomposition. This difference is probably due to the duration of decomposition, which in our experiment is shorter than in his, as it is expected that when organic matter decomposes perfectly into carbondioxide and ammonia, the reaction of the soil solution should be changed into alkaline.

When the acidity of the soil solution in our experiment was titrated with alkali solution, green colloidal precipitate was produced. The degree of acidity and the amount of precipitate was equally increased with the process of decomposition of soybean cake.

Next, for the purpose of elucidating the nature of acidity of the soil solution, we examined the composition of the soil solution and found silicic, phosphoric, sulfuric, carbonic, organic fatty and amino acid present. Hydrochloric acid was only present in trace while no nitric acid was observed in the solution. Among organic fatty acids, the presence of formic, acetic and lactic acid were positively confirmed as in the results obtained by Tazaki and Imai (1909) and Onodera (1916) in their experiment with organic manure. The presence of butylic acid also was doubtfully proved in our experiment. As the bases ammonia, iron, aluminium, manganese, calcium, magnesium, sodium and potassium were proved to be present.

The amount of silicic, phosphoric and sulfuric acid was determined by the usual gravimetric method. The amount of carbonic acid was also measured by means of barium hydroxide which absorbs carbondioxide evolved from the soil solution after being acidified with phosphoric acid. The results obtained are shown in the following Table II.

TABLE II.

The amount of carbonic, silicic, phosphoric and sulfuric acid in the soil solution.

Duration of decomposition	Amount per 100 gm. soil.			
	CO_2	SiO_2	P_2O_5	SO_3
days	*gm.*	*gm.*	*gm.*	*gm.*
10	Trace	0.0068	0.00095	0.00223
20	0.01890	0.0058	0.00080	0.00115
30	0.02770	0.0063	0.00356	0.00292
40	0.04385	0.0068	0.00356	0.00312
50	0.05625	0.0042	0.00159	0.00498
60	0.06555	0.0046	0.00113	0.00332

The amount of carbonic acid dissolved out in the soil solution gradually increased as the decomposition proceeded, while that of silicic and sulfuric acid was not increased so much. The amount of phosphoric acid increased to the 40th day, then it gradually decreased.

Organic fatty acids were separately measured as volatile and non-volatile acids. For determination of volatile fatty acids, the steam distillation method was adopted. The distillation was continued to the point where the acidity of the distillate was constant. Since none of the mineral acids were found in the distillate, the amount of free volatile acids were then titrated directly from this distillate with N/100 HaOH using phenolphtalein as an indicator. The total amount of volatile acid was not measured, however, by this titration, because a large amount of ammonia was observed in the distillate, neutralizing a great part of volatile acid in the same. The total amount of volatile acid was then calculated by the addition of the number of cc. of N/100 NaOH equivalent to ammonia distilled out to cc. of N/100 NaOH really used for titration. The amount of non-volatile acid was shown with cc. of N/100 NaOH used for titration of the residual solution after distillation, using phenolphtalein as an indicator. In this case ammonia was not found in the solution and some of the mineral acids were precipitated combining with mineral bases. Though another mineral acid was present in the solution it was combined with bases without any influence on the acidity of the solution. Then this titration number denotes the acidity of free non-volatile organic fatty acid. The result obtained is shown in Table III.

TABLE III.

The amount of volatile and non-volatile organic fatty acid in the soil solution.

Duration of decomposition	The amount of volatile organic fatty acid (cc. of N/100 NaOH per 100 gm. soil)		The amount of free non-volatile organic fatty acid (cc. of N/100 NaOH per 100 gm. soil)
	Free acid	Total acid	
days	*cc.*	*cc.*	*cc.*
10	21.0	72.0	7.5
20	27.5	257.0	10.0
30	40.0	325.5	12.5
40	80.0	517.5	13.5
50	100.0	552.0	15.0
60	200.0	590.0	20.0

The amount of organic fatty acid was continually increased through the whole period of decomposition. But the amount of non-volatile organic fatty acid was smaller than that of volatile organic fatty acid.

The amount of amino acid was very small. Especially, in the final stage of decomposition in our experiment its quantity was negligibly small, then, determination was not carried on.

The amount of ammonia existing in the soil solution was measured by the colorimetric method which was proposed by the

Bureau of Soil, Department of Agriculture, U. S. A. The analysis of mineral bases was carried on according to the usual gravimetric method. The result obtained is shown in the following table.

TABLE IV.

The amount of ammonia, iron, aluminium, manganese, calcium, magnesium, potassium and sodium in the soil solution.

Duration of decomposition	Amount per 100 gm. soil.			
	NH_3	Fe_2O_3	Al_2O_3	Mn_2O_3
days	gm.	gm.	gm.	gm.
10	trace.	0.0079	0.0105	0.0045
20	0.0276	0.0148	0.0235	0.0057
30	0.0440	0.0265	0.0335	0.0130
40	0.0628	0.0335	0.0425	0.0185
50	0.0630	0.0360	0.0590	0.0540
60	0.0700	0.0330	0.0600	0.0205
	CaO	MgO	Na_2O	K_2O
days	gm.	gm.	gm.	gm.
10	0.00924	0.00471	0.00189	0.00458
20	0.01498	0.00734	0.00723	0.00274
30	0.02800	0.00615	0.00767	0.00362
40	0.03164	0.00833	0.00213	0.00408
50	0.04900	0.00508	0.01286	0.00669
60	0.04116	0.00870	0.00716	0.00339

The amount of ammonia which dissolved out in the soil solution was increased gradually as the decomposition proceeded. Among mineral bases, aluminium, iron, manganese and calcium increased their amount considerably, while magnesium, sodium and potassium increased their amount not so much as the former bases through the period of the decomposition.

To clear the effect of decomposing soybean cake upon the solubility of mineral matter of soil, the amount of inorganic constituents dissolved out from soil by distilled water was next measured with the following result.

TABLE V.

The amount of inorganic constituents dissolved out from the soil by addition of distilled water.

Name	Amount per 100 gm. soil	Name	Amount per 100 gm. soil
	gm.		gm.
SiO_2	0.00104	CaO	0.00229
P_2O_5	0.00305	MgO	0.00047
SO_3	0.00550	Na_2O	0.00058
Fe_2O_3	0.00070	K_2O	0.00089
Al_2O_3	0.00070	Cl	trace.
Mn_2O_3	0.00050		

The table denotes that a small amount of iron, aluminium, manganese and calcium was dissolved out from the soil alone, while a large amount of these bases was dissolved out by the addition of soybean cake. The amount of acids dissolved out in our experiment after the addition of soybean cake was generally small as compared with that of the above bases. And the amount of sulfuric and phosphoric acids was much smaller than that of acids dissolved out from the soil alone. Magnesium, potassium and sodium compared with the other bases were dissolved out a little more in the solution than those of soil alone.

Jensen (1917) reported that a large amount of iron, calcium and phosphoric acid dissolved out by the addition of green manure or stable manure or of its extracts. Funches (1918) mentioned also in his paper that a large amount of manganese, a little chloride or sulfate, a mere trace of iron and aluminium or none, and very high nitric acid dissolved by the addition of dried blood and cotton meal. These results were obtained, however, in experiments which were carried out with soil in the ordinary field condition. Onodera (1919) conducted his experiment in rice field and found just the same result as we found after the addition of Astragalus sinicus. The form of iron dissolved out in the soil solution was tested with potassium ferro- and ferri-cyanide. A large part of it was found to exist in the state of ferrous compound. This fact coincides with that reported by Onodera (1919).

Ash constituents of the soybean cake were analyzed, to clear the relation between the amount of mineral constituents found in the soil solution and the amount of ash constituents of soybean cake added to the soil. The result obtained is shown in Table VI.

TABLE VI.

The amount of ash ingredients of soybean cake.

Name	Amount per 100 gm. air dried soybean cake.	Amount added to the soil 100 gm.
	gm.	gm.
P_2O_5	1.088	0.0272
SO_3	0.409	0.0102
CaO	0.162	0.0041
MgO	0.360	0.0090
Na_2O	trace	trace
K_2O	2.494	0.0623

According to the above table, the amount of calcium added to the soil as the ash constituents of soybean cake was smaller than that dissolved out into the soil solutions. On the other hand, while large amounts of potassium, magnesium, phosphoric and sulfuric acids were added to the soil by manure, a small amount of these appeared in the soil solution. Taking the above two results into consideration, the soil constituents which undergo an influence by decomposing organic matter and increase their solubility might be aluminium, iron, manganese, calcium, sodium and silicic acid. Other constituents appearing in the soil solution might probably originate from the manure added.

When alkali was added to the soil solution for titration, a green colloidal precipitate was produced changing its color gradually into brown. The precipitate formed was found by analysis to be constituted from iron, aluminium, manganese, calcium, phosphoric and silicic acid. Among these constituents aluminium, iron and manganese were especially large in amount, as shown in the following table.

TABLE VII.

Mineral matter present in the soil solution and mineral constituents of the precipitate formed from it by addition of alkali.

	Name	Amount in 500 cc. of soil solution	Amount in the precipitate formed by titration from 500 cc. of soil solution
Result obtained with the sample at 40 days		*gm.*	*gm.*
	SiO_2	0.00680	0.00460
	P_2O_5	0.00356	0.00287
	Fe_2O_3	0.03350	0.03200
	Al_2O_3	0.04250	0.04050
	Mn_2O_3	0.01850	0.01550
	CaO	0.03160	0.00975
Result obtained with the sample at 50 days	SiO_2	0.01420	0.01120
	P_2O_5	0.00159	0.00159
	Fe_2O_3	0.03600	0.03450

	Name	Amount in 500 cc. of soil solution	Amount in the precipitate formed by titration from 500 cc. of soil solution
		gm.	gm.
Result obtained wth the sample at 50 days	Al_2O_3	0.05900	0.05650
	Mn_2O_3	0.05400	0.02350
	CaO	0.04900	0.00420
Result obtained with the sample at 60 days	SiO_3	0.00460	0.00460
	P_2O_5	0.00113	0.00113
	Fe_2O_3	0.03250	0.03300
	Al_2O_3	0.06000	0.05950
	Mn_2O_3	0.02050	0.01050
	CaO	0.04116	0.01372

When the soil solution had been kept standing for a short time, a brown precipitate was also produced and its acidity was decreased. Although a great amount of carbondioxide was detected in the soil solution as shown in the above table, no more carbondioxide could be detected in the same after standing as shown in Table VIII. And this precipitate was also found to be mainly composed of iron, aluminium and manganese as is produced by titration of the soil solution with alkali. But the amount of these bases was not so large in the precipitate formed by the titration.

TABLE VIII.

Constituents of the precipitate formed from the soil solution of 50 days after standing for a short time.

Name	Amount in the precipitate formed by standing from 100 cc of soil solution	Name	Amount in the precipitate formed by standing from 100 cc. of soil solution
	gm.		gm.
SiO_2	0.00134	Al_2O_3	0.00560
P_2O_5	0.00032	CaO	0.00190
Fe_2O_3	0.00440	SO_3	0.00056
Mn_2O_3	0.00240		

Acidity of the soil solution before standing.	77.6 cc.
Acidity of the same after standing for a short time.	32.0 cc.
Carbondioxide.	None.

As shown above, the precipitate which appeared in the soil solution by titration with alkali or by standing for a short time was always composed of aluminium, iron and manganese. Then, from the stand point of mineral bases correlation will exist between the acidity of the soil solution and the amount of iron, aluminium and manganese dissolved out in the same. In reality, we found in our experiment that the amount of iron, aluminium and manganese dissolved out in the soil solution and its acidity was increased with approximatly the same ratio.

TABLE IX.

Ratio of amount of acidity of the soil solution, iron, aluminium and manganese dissolved out in the same by the decomposition of soybean cake.

Duration of decomposition	Ratio of amount			
	Acidity	Fe_2O_3	Al_2O_3	Mn_2O_3
days 10	1.0	1.0	1.0	1.0
20	1.577	2.114	2.238	1.277
30	3.020	3.784	3.190	2.888
40	4.026	4.785	4.047	4.111
50	5.221	5.143	5.619	12.000?
60	5.033	4.718	5.714	4.555

The cause of acidity appearing in the rice field after the addition of organic manure, has been believed hitherto to be mainly organic acid produced as a result of decomposition of the manure. In our experiment, the amount of mineral acid, as sulfuric, phosphoric, and silicic acid dissolved out in the soil solution is very small, as shown already. Consequently, these mineral acids contribute little to the cause of the acidity of the soil solution. The slight amount of amino acid found in the soil solution is also not considered to be a factor in the acidity of the solution, because not only is its amount slight, but also the reaction of amino acid is ordinarily neutral. On the contrary, a large amount of organic fatty acid was found in the soil solution. This organic fatty acid may be considered to be present in the soil solution as a free acid and combined with aluminium, iron and manganese. Therefore, it may be expected that this organic fatty acid in both forms is mainly the cause of the acidity of the soil solution, for the amount of alkali needed for neutralization of acid and for precipitation of bases from their salts as hydrate is denoted as the acidity. But it can not be said that this free and combined fatty acid is the only cause of the acidity of the soil solution, for in our experiment, the acidity of the soil solution measured was always higher than that of free organic fatty acid in the distillate of the same solution. Though a larger amount of ammonia was found in the distillate than in the original soil solution, some nitrogenous matter having decomposed into ammonia during the distillation and being distilled out in the distillate, the amount of ammonia excess in the distillate was not so much as to give an explanation for the higher acidity of the soil solution. For instance, the amount of ammonia existing in the distillate from 100 cc. of soil solution was 0.0159 gm. and 0.0125 gm. of ammonia was present in the soil solution at 40 days after the addition of manure. At 50 days the amount of ammonia was 0.0126 gm. in the soil solution and 0.01600 gm. in the distillate. The cc. of N/100 NaOH equivalent to the excessive amount of ammonia in the distillate is 17.65 and 18.17 cc. at 40 and 50 days respectively. However, the total amount of N/100 NaOH equivalent to ammonia in excess and that of N/100 NaOH really used for titration of free acid does not reach to the acidity of the original soil solution. From this fact, it seems that there is one more cause for the acidity of the soil solution in addition to the free organic fatty acid and its salts.

When the soil solution was kept standing for a short time, aluminium, manganese, iron etc. were precipitated, and its acidity was measured, and carbondioxide disappeared from the soil solution as mentioned already. From this fact it may be considered that carbondioxide combined with these bases as a bicarbonate is decomposed by standing to free carbondioxide and the bases are precipitated in the soil solution. If the soil solution is titrated with alkali, bicarbonate of iron, aluminium and manganese change, therefore, into hydrate and make precipitate. The amount of alkali which is used to produce the precipitate from the bicarbonate of these bases thus indicates one part of acidity of the soil solution. Then, it seems that the main cause of acidity of the soil solution is not only the free organic fatty acid, but also the mineral salts of organic and carbonic acid produced by the decomposition of soybean cake. And at the beginning of the decomposition organic fatty acid and its mineral salts mainly cause the acidity of the soil solution, while the decomposition proceeded organic and carbonic acid and their mineral salts effect the acidity of the soil solution.

Taking the acidity, the amount of carbondioxide, organic fatty acids and ammonia in the soil solution, also the amount of the constituents of the precipitate produced by titration with alkali, the following calculation was made.

The soil solution 40 days after the addition of manure.

1) The constituents and their amount of precipitate formed by titration with N/100 NaOH from the soil solution.

Name	Amount in the precipitate produced from 100 cc. of the soil solution	cc. of N/100 NaOH equivalent to the amount of each constituents
	gm.	*cc.*
SiO_2	0.00092	2.934
P_2O_5	0.00058	2.330
Fe_2O_3	0.00640	15.560

Name	Amount in the precipitate produced from 100 cc. of the soil solution	cc. of N/100 NaOH equivalent to the amount of each constituents
	gm.	cc.
Al_2O_3	0.00810	23.370
Mn_2O_3	0.00310	7.550
CaO	0.00195	6.689

2) Acidity of 100 cc. of the soil solution.	60.0 cc.
3) Carbondioxide as CO_2 in 100 cc. of soil solution.	0.00857 gm.
cc. of N/100 NaOH equivalent to amount of carbondioxide.	40.12 cc.
4) Volatile organic acid in 100 cc. of the soil solution.	103.5 cc.
5) Non-volatile organic acid in 100 cc. of the soil solution.	2.5 cc.
6) Ammonia as NH_3 in 100 cc. of the soil solution.	0.0125 gm.
cc. of N/100 NaOH equivalent to amount of ammonia.	69.85 cc.

Therefore,

Al_2O_3, Fe_2O_3, Mn_2O_3 and CaO as base		53.17
+) NH_3	as base	69.85
total base		123.02
SiO_2 and P_2O_5	as acid	5.264
Volatile organic acid	as acid	103.5
Non-volatile organic acid	as acid	2.5
+) CO_2	as bicarbonate	20.06
total acid		131.324

131.324 − 123.02 = 8.304....free acid in the soil solution.

On the other hand,

Total acidity	60.0
−) Total mineral substance as base	53.17
free acid in the soil solution	6.83

then 8.304 and 6.83 nearly coincide.

From the above result the acidity of the soil solution is calculated to be caused by the following compounds.

Acidity caused by free acid	6.83
Acidity caused by bicarbonate of Al, Fe, Mn and Ca	20.06
Acidity caused by phosphate and silicate.	5.264
+) Acidity caused by organic acid salts of Al, Fe and Mn	27.845
	59.999

Calculated and observed acidity coincide satisfactorily. Al, Fe and Mn salts of bicarbonate and organic acid are, therefore, mainly responsible for titratable acidity of the soil solution and free acid is not so largely responsible.

The soil solution 50 days after the addition of manure.

1) The constituents and their amount of precipitate formed by titration with N/100 NaOH from the soil solution.

Name	Amount in the precipitate produced from 100 cc. of the soil solution	cc. of N/100 NaOH equivalent to the amount of each constituents
	gm.	cc.
SiO_2	0.00224	7.15
P_2O_5	0.00036	1.298
Fe_2O_3	0.00690	16.65
Al_2O_3	0.01130	30.98
Mn_2O_3	0.00270	11.64
CaO	0.00084	2.40

2) Acidity of 100 cc. of the soil solution.	77.6 cc.
3) Carbondioxide as CO_2 in 100 cc. of soil solution.	0.00875 gm.
cc. of N/100 NaOH equivalent to amount of carbondioxide.	55.46 cc.
4) Volatile organic acid in 100 cc. of the soil solution.	110.41 cc.
5) Non-volatile organic acid in 100 cc. of the soil solution.	3.0 cc.
6) Ammonia as NH_3 in 100 cc. of the soil solution.	0.0126 gm.
cc. of N/100 NaOH equivalent to amount of ammonia.	71.24 cc.

Therefore,

Al_2O_3, Fe_2O_3, Mn_2O_3 and CaO	as base	61.67
+) NH_3	as base	71.24
total base		132.91
SiO_2 and P_2O_5	as acid	8.448
Volatile organic acid	as acid	110.41
Non-volatile organic acid	as acid	3.0
+) CO_2	as bicarbonate	27.73
total acid		149.588

149.588 − 132.91 = 16.678 ....free acid in the soil solution.

On the other hand,

Total acidity	77.6
—) Total mineral substance as base	61.67
free acid in the soil solution	15.93

then 16.678 and 15.93 closed in quantity.

From the above result the acidity of the soil solution is calculated to be caused by the following compounds.

Acidity caused by free acid	15.93
Acidity caused by bicarbonate of Al, Fe, Mn and Ca	27.73
Acidity caused by phosphate and silicate	8.448
+) Acidity caused by organic acid salts of Al, Fe and Mn	25.492
	77.6

Calculated and observed acidity coincide satisfactorily.

The soil solution 60 days after the addition of manure.

1) The constituents and their amount of precipitate formed by titration with N/100 NaOH form the soil solution.

Name	Amount in the precipitate produced from 100 cc. of the soil solution	cc. of N/100 NaOH equivalent to the amount of each constituents
	gm.	*cc.*
SiO_2	0.00092	2.94
P_2O_5	0.00024	0.91
Fe_2O_3	0.00660	15.93
Al_2O_3	0.01190	28.60
Mn_2O_3	0.00210	5.23
CaO	0.00274	9.42

2) Acidity of 100 cc. of the soil solution.	75.0 cc.
3) Carbondioxide as CO_2 in 100 cc. of soil solution.	0.01311 gm.
cc. of N/100 NaOH equivalent to amount of carbondioxide.	61.0 cc.
4) Volatile organic acid in 100 cc. of the soil solution.	118.03 cc.
5) Non-volatile organic acid in 100 cc. of the soil solution.	4.0
6) Ammonia as NH_3 in 100 cc. of the soil solution.	0.01400 gm.
cc. of N/100 NaOH equivalent to amount of ammonia.	79.18 cc.

Therefore,

Al_2O_3, Fe_2O_3, Mn_2O_3 and CaO as base	59.18

+)NH_3	as base	79.18
total base		138.36
SiO_2 and P_2O_5	as acid	3.85
Volatile organic acid	as acid	118.03
Non-volatile organic acid	as acid	4.0
+)CO_2	as bicarbonate	30.5
totale acid		156.38

156.38−138.36=18.02....free acid in the soil solution.

On the other hand,

Total acidity	75.0
−)Total mineral substance as base	59.18
free acid in the soil solution	15.82

then 18.02 and 15.82 nearly coincide in quantity. According to the above result the compounds effecting the acidity of the soil solution are calculated as follows.

Acidity caused by free acid	15.82
Acidity caused by bicarbonate of Al, Fe, Mn and Ca	30.5
Acidity caused by phosphate and silicate	3.85
+)Acidity caused by organic acid salts of Al, Fe and Mn	24.83
	75.00

Calculated and observed acidity are entirely similar.

SUMMARY.

The nature of acidity appearing in soil water after the addition of soybean cake to the rice field was examined and the result obtained was summarized as follows.

Organic acid and carbondioxide are mainly responsible for the cause of the acidity of the soil solution. However, titratable acidity is due mainly to soluble iron, aluminium and manganese compounds combined with these acids. A large amount of organic acid is contained in the soil solution. As it is however largely combined with ammonia and other bases, it does not concern so much in the titratable acidity of the soil solution.

REFERENCES.

Funchess, M. G. (1918): Alabama Agr. Expt. Sta. Bull., **201**, 37.
Hibbared, P. L. (1919): Soil Science, **7**, 259.
Ishiwatari, A. (1914): Graduation thesis, Coll. Agr. Hokkaido Imp. Univ.
Jensen, C. A. (1917): Journ. Agr. Res., **9**, 253.
Miller, M. F. (1917): Mo. Agr. Expt. Sta. Bull., **147**, 50.
Onodera, I. (1916): Journ. Sci. Agr. Soc. (Japan), **176**, 285.
Onodera, I. (1918): Journ. Sci. Agr. Soc. (Japan), **190**, 667.
Onodera, I. (1918): Journ. Sci. Agr. Soc. (Japan), **191**, 786.
Onodera, I. (1919): Journ. Sci. Agr. Soc. (Japan), **197**, 14.
Onodera, I. (1919): Journ. Sci. Agr. Soc. (Japan), **205**, 725.
Potter, R. S. and Snyder, R. S. (1917): Journ. Agr. Res., **11**, 677.
Russel, E. J. and Appleyard, A. (1917): Journ. Agr. Sci., **8**, 385.
Skinner, J. J. and Beattie, J. H. (1917): Journ. Amer. Agron., **9**, 25.
Stephenson, R. F. (1918): Soil Sci., **6**, 413.
Stephenson, R. F, (1921): Soil Sci., **12**, 145.
Takaishi, M. (1909): Journ. Sci. Agr. Soc. (Japan), **89**, 1.
Tazaki, K. and Imai, M. (1909): Journ. Sci. Agr. Soc. (Japan), **89**, 14.
White, J. H. (1918): Journ. Agr. Res., **13**, 171.

EFFECT OF VARIOUS SUBSTANCES ON THE VITALITY OF RED BLOOD CORPUSCLES.

By

SHINJIRO KIKUCHI.

(From the Biochemical Labolatory, Institute of Medical Chemistry, Tokyo Imperial University, Tokyo. Director: Prof. S. Kakiuchi.)

(Received for publication, August 1, 1923.)

I. INTRODUCTION.

Symptoms on the part of the recipient and the fate of the blood corpuscles in the case of blood transfusion have hitherto been studied by various workers, Hippolito Magnani was the first to observe the hemoglobinuria in the recipient of the blood transfusion. Batelli claims that the blood, against which the blood serum of the rabbit possesses hemolysin, exerts toxic action on the rabbit. R. Gottlieb and G. Lefmann (1907) assumed that the stroma when dissolved by the hemolysis in the body of the recipient would liberate the toxin and studied lipoid matter of the blood corpuscles of the dog, cat and rabbit, and concluded that the ether extract of the foreign blood corpuscles acts as toxin, this being the cause of the sudden death of the dog or rabbit which occasionally takes place when the washed foreign blood corpuscles is transfused. They remarked that the ether extract of the blood corpuscles of the foreign blood causes invariably the sinking of the blood pressure and the rapid death of the recipient whereas blood of the same species would not be attended with the same danger. Differing from this exploitation F. Coca (1909) thinks that the cause of the sudden death is due to the occlusion of the capillaries and arterioles of the lungs by the transfused blood corpuscles and this condition is again attributed to the agglutinin in the recipient's blood and to an agglutinating function of the endotherial cells of the walls of the blood vessels. But the fact that when the animals survive after the blood transfusion the injected blood corpuscles undergo more or less rapid disintegration and disappear from the circulating blood, has been proven by experiments of Berfanthi and Carbone (1898), Ehrlich and Morgenroth, Bordet, v. Dungern and Landsteiner etc. As to the duration of the maintenance of the injected blood corpuscles in the recipient the researches of Marfels and Maleschott (1856), Brown-Sequard (1857), Panum (1863), Ponfick (1873), Hunter (1886), H. Sachs (1903), Todd and White (1911), Rous and Turner (1916), T. Torii (1919), Kambe and Komiya (1920), and Watanabe and Harada (1921) are found to be of value.

It is easily imagined that the vitality of the transfused blood corpuscles has direct bearing on the duration of the maintenance in the recipient's body and therefore it is of vital importance to know just what condition influences the vitality of the transfusing blood corpuscles. In regard to this point, however, only a few reliable works are to be found in spite of the abundance of the researches on the subject of the hemolysis questions in vitro.

According to P. Rous and J. R. Turner (1916) the blood cells of each species can be kept unaltered in a special preservative mixture, for instance, human blood cells are best kept in saccharose-Lock's mixture containing about 5% of the sugar. Washed blood cells of the rabbit remain unhemolyzed longest in plasma-Lock's citrate, slightly over two weeks. They found that erythrocytes of rabbits, preserved in the mixture for two weeks and transfused in the rabbit's system, continue to circulate and function so well satisfactorily that the animal shows no disturbances, and the blood cell count, hemoglobin content, urine and percentage of reticulated red cells remain unvaried, It was also found that blood cells kept for longer periods (23 days), though they appear intact and unchanged, soon disappear from the circulation, when transfused into the blood vessel. Kambe and Komiya made similar experiments, studying more carefully the morphological changes of the recipients' blood corpuscles. Watanabe and Harada used hen and hen's blood as materials on the same thesis and concluded that the blood kept 5 days in ice chest can remains in the recipient, while blood corpuscles kept longer in the refrigerator soon disappear from the recipient's circulation though they appear entirely intact and unaltered. In a study of glycolytic function, Y. Kawashima (1922) noted that the injection of the fresh washed erythrocytes of the rabbit into the abdominal cavity of another rabbit will be followed by polycythaemia without any trace of hemoglobin in the urine. Contrary to the above effect, the blood cells which have been kept 24 hours in the incubator (37°C) and are deprived of their glycolytic character, when injected into the abdominal cavity, will cause no polycythaemia but cause hemoglobinuria and choleuria. The same author observed that the blood cells when they are kept 24 hours in a refrigerator still possess glycolytic character and act in the same manner as the fresh cells when injected into the abdominal cavity.

From what has preceded it is apparent that the vitality of the red blood cells is variously influenced by manifold artificial and natural conditions. The present study is made in the hope of finding out the various conditions which affect the vitality of the blood corpuscles by tracing accurately the fate of the transfused blood cells previously treated.

II. TECHNIQUE.

The following are the representative methods for the tracing of the transfused red blood cells :

1) Nucleolated erythrocytes are transfused into animals having non-nucleolated erythrocytes (or vise versa) and counted

directly under the microscope from time to time (Marfels and Maleschott, Brown-Sequard, Magendie etc.).

2) The duration of the time in which the transfused blood cells remain in the body is estimated by considering the number of cells and hemoglobin content together with other alterations which might occur (Siegel and Maydl, Dattmar, W. Schultz, Hunter, Rous and Turner, Kambe and Komiya, Watanabe and Harada, Torii etc.).

3) Hemolysin obtained from the rabbit by means of the repeated injection of the blood of the ox is rendered inactive. To this a certain quantity of washed blood corpuscles of the rabbit, which has been transfused with ox's blood, and the normal rabbit's serum are added. So long as the ox's blood remains in the rabbit hemolysis will occur in this system and this can be measured colorimetrically (H. Sachs, 1903).

The method used by W. Ashby (1919) in a study of "The determination of the length of life of transfused blood corpuscles in man" seems, however, to the writer to be much simpler and more accurate than the preceding methods. Ashby, basing his idea on the isoagglutinating group of the human blood (K. Landsteiner, 1901, Sanford, 1918), concluded as follows: It is possible in mixture of corpuscles of different groups to separate the corpuscles practically quantitatively by treating them with a citrated serum that agglutinates the corpuscles of one kind, leaving the others unagglutinated. After a recipient has been transfused with the blood of a group other than his own, specimens of his blood when treated with a serum which will agglutinate his own corpuscles but not the transfused corpuscles, will show unagglutinated corpuscles in large numbers. As these unagglutinated corpuscles represent the transfused corpuscles, their count is a quantitative indicator of the amount of transfused blood still remaining in the recipient's circulation.

According to the principle of the above method the writer carried out his experiments as follows: The guinea pig was treated three times with the blood of the rabbit and the serum thus obtained was rendered inactive. This serum being added with 5% carbolic acid (1/10 volume of the serum) and 4.4% sodium citrate (1/20–1/10 volume of the serum) was used in the place of Ashby's agglutinating serum. This can be used for a long time when kept in a refrigerator.

Blood from the ear of the rabbit, into which the blood to be examined had been transfused, was taken up to the 0.1 mark of the white cell counting pipette, mixed with 19 times its volume of the agglutinating serum and well shaken. It was then incubated at 37°C for 40 minutes with thorough shaking every 10 minutes and was transferred into an ice chest for a certain hours. The content was then thoroughly shaken and a drop of it was placed on a red blood cell counting chamber (Thoma-Zeiss) and a count of the unagglutinated blood corpuscles was made. At least 160 squares in each of two chambers were counted and the average was taken. The whole number thus obtained, however, can not be regarded as a direct indicator of the undestroyed transfused blood, for a small number of the normal blood corpuscles of the rabbit would remain unagglutinated by the same test. The latter number was, therefore, substracted from the above mentioned count.

In the preliminary test the counting was carried out in agglutinating the mixture in vitro of the rabbit's blood and of the blood to be transfused in a known ratio, resulting in the practical coincidence of calculated and counted numbers of the unagglutinated cells so far as examined within 3 to 7 hours (Table I and II). This method seems, therefore, to excel other procedures in which the blood cell count is simply made. The test tube should be shaken lightly 50 times before the examination in order that the mixture shall attain an even suspension. If the mixture were kept more than 7 hours the result would be different on account of the hemolysis appearing.

TABLE I.

Differential agglutination in vitro, using the mixture of blood corpuscles of guinea pig and rabbits.

No. of test tube	Proportion of the blood of guinea pig (1,110,000 corpuscles per 1 cmm.) mixed with that of rabbit	Proportion of the mixed blood suspension with agglutinating serum	Counted number of the unagglutinated corpuscles in 1 cmm. of blood-serum mixture minus 50 = A	Calculated number of the unagglutinated corpuscles in 1 cmm. of blood-serum mixture = B	$\frac{A}{B}$	Time intervening between mixing (blood with serum) and counting, in hours
1	1:49	1:19	1139	1110	1.03	1 ½
2	,,	,,	985	,,	0.89	3
3	,,	,,	1199	,,	1.08	3 ½
4	,,	,,	1020	,,	0.92	4
5	,,	,,	936	,,	0.84	5
6	,,	,,	936	,,	0.84	6
7	,,	,,	950	,,	0.86	7
8	,,	,,	884	,,	0.80	12
9	,,	,,	650	,,	0.59	19
10	,,	,,	616	,,	0.56	24
11	Rabbit's blood alone	,,	50			3
12	,,	,,	51			5
13	,,	,,	30			19
14	Guinea pig's blood alone	,,	56325	55500	1.01	3
15	,,	,,	53200	,,	0.96	5
16	,,	,,	39025	,,	0.70	19
17	,,	,,	35125	,,	0.63	24

TABLE II.

Differential agglutination in vitro, using the mixture of blood corpuscles of rabbit and ox or pig.

No. of test tube	Proportion of ox's blood (5,310,000 corpuscles per 1 cmm.) mixed with that of rabbit	Proportion of the mixed suspension with agglutinating serum	Counted number of the unagglutinated corpuscles in 1 cmm. of blood-serum mixture minus 246=A	Calculated number of unagglutinated corpuscles in 1 cmm. of blood-serum mixture=B	$\frac{A}{B}$	Time intervening between mixing (blood with serum) and counting in hours
1	1:21	1:19	12040	12070	0.99	$3\frac{1}{4}$
2	1:49	,,	5040	5310	0.95	3
3	Ox's blood alone	,,	No agglutination, no hemolysis			$3\frac{1}{2}$
4	Rabbit's blood alone	,,	246			$3\frac{1}{2}$
	Pig's blood (4,830,000 corpuscles per 1 cmm.) instead of ox's blood					
5	1:21	,,	10360	10980	0.94	3
6	1:49	,,	5220	4830	1.08	3
7	Pig's blood alone	,,	No agglutination, no hemolysis			$3\frac{1}{2}$

Blood corpuscles, used in the preliminary tests in Table I and II, were suspended in 0.9% saline solution after thorough washing and mixed by means of white cell counting pipette.

The similar tests using the blood corpuscles of the dog, bird and ram came practically to the same results.

III. Material.

The rabbit was used as recipient merely for convenience sake. The blood to be tested must be naturally that which will remain in the circulation for a long period. The writer has examined the duration of time in which the blood corpuscles of various species remain in rabbit's circulation and the result is shown in the following tables. The blood to be transfused must be defibrinated, freed from serum, and washed thoroughly with 0.9% saline solution. Ca. 50% of the blood suspension is made with 0.9% saline solution and a certain amount of it is injected into the ear vein of the rabbit. Transfusion is carried out in 2–4 minutes, avoiding the artificial plethra by previous withdrawal of appropriate amount of blood from the recipient.

TABLE III.

Transfusion of the blood corpuscles of the guinea pig.

Rabbit			No. 2. Body weight 2,750 gm.	No. 3. Body weight 2,690 gm.	No. 4. Body weight 2,630 gm.
Amount of blood transfused			10.5 cc. containing 5,130,000 corpuscles per cmm.	9 cc. containing 5,605,000 corpuscles per cmm.	10 cc. containing 5,645,000 corpuscles per cmm.
Red cell count per cmm.	Before transf.		5,300,000 (2 days) 5,080,000 (1 day)	5,585,000 (2 days) 5,555,000 (1 day)	5,730,000 (1 day)
	After transf.		3,500,000 (135 min.)	5,140,000 (1 days)	
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Before transf.		8,060 (2 days) 6,500 (1 day) 7,000 (25 min.)	5,900 (2 days) 6,300 (1 day)	16,200 (1 day)
	Time after the transfusion	1 m.		68,000	
		2 m.		33,600	240,000
		4 m.	223,500	18,000	64,000
		6 m.	138,500	6,500	40,800
		8 m.	96,000		27,600
		10 m.	71,500	4,700	18,600
		12 m.	54,500		

Rabbit			No. 2. Body weight 2,750 gm.	No. 3. Body weight 2,690 gm.	No. 4. Body weight 2,630 gm.
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Time after the transfusion	14 m.	51,000		
		16 m.	41,500		12,400
		18 m.	29,500	6,000	
		24 m.	24,700		13,600
		34 m.			18,800
		36 m.	5,800		
		38 m.	5,400	6,800	
		46 m.	7,700		
		136 m.	8,900		

TABLE IV.

Transfusion of the blood corpuscles of the horse.

Rabbit			No. 5. Body weight 2,030 gm.	No. 6. Body weight 2,230 gm.
Amount of blood transfused			8 cc. containing 8,640,000 corpuscles per cmm.	do
Red cell count per cmm.	One day before transf.		5,950,000	6,157,000
	One day after transf.		5,150,000	5,325,000
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	One day before transf.		14,600	25,800
	Time after the transf.	1 m.	25,400	
		2 m.		47,800
		5 m.	15,300	20,800
		9 m.		23,700
		12 m.	16,800	14,000
		30 m.	15,400	

TABLE V.

Transfusion of the blood corpuscles of the pig.

Rabbit			No. 7. Body weight 2,280 gm.	No. 8. Body weight 2,300 gm.
Amount of blood transfused			8 cc. containing 6,090,000 corpuscles per cmm.	6 cc., cell count do
Red cell count per cmm.	One day before transf.		6,460,000	6,077,000
	One day after transf.		5,910,000	5,686,000
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	One day before transf.		18,800	24,200
	Time after the transf.	9 m.		17,600
		10 m.	12,600	
		12 m.		18,400
		14 m.	13,600	
		17 m.	13,600	
		30 m.	17,900	
		35 m.		22,500

TABLE VI.

Transfusion of the blood corpuscles of the rat.

Rabbit		No. 9. Body weight 1,450 gm.	No. 10. Body weight 1,600 gm.
Amount of blood transfused		6.7 cc. containing 6,050,000 corpuscles per cmm.	6.5 cc., cell count do
Red cell count per cmm.	One day before transf.	5,350,000	6,557,000
	One day after transf.	5,070,000	6,175,000
	One day before transf.	28,600	24,800

Rabbit			No. 9. Body weight 1,450 gm.	No. 10. Body weight 1,600 gm.
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Time after the transf.	4 m.	29,400	
		7 m.	28,400	19,600
		10 m.	34,600	10,200
		120 m.	30,100	20,800

TABLE VII.

Transfusion of the blood corpuscles of the cat.

Rabbit			No. 11. Body weight 1,430 gm.	No. 12. Body weight 1,450 gm.
Amount of blood transfused			7 cc. containing 6,195,000 corpuscles per cmm.	6.5 cc., cell count do
Red cell count per cmm.	One day before transf.		6,435,000	5,230,000
	One day after transf.		5,930,000	4,860,000
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	One day before transf.		24,800	35,200
	Time after the transf.	1 m.	23,600	66,800
		16 m.	26,100	33,600
		19 m.	24,000	
		30 m.		34,000
		60 m.		25,400

TABLE VIII.

Transfusion of the blood corpuscles of the ram.

Rabbit			No. 13. Body weight 1,800 gm.	No. 14. Body weight 2,050 gm.
Amount of blood transfused			9 cc. containing 8,750,000 corpuscles per cmm.	9.8 cc., cell count do
Red blood cell count per cmm.	One day before transf.		6,980,000	7,100,000
	One day after transf.		6,410,000	6,395,000
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	One day before transf.		84,000	88,600
	Time after transf.	7 m.	54,600	
		9 m.		123,600
		25 m.	70,500	85,800
		40 m.		79,300
		54 m.	54,200	87,500

TABLE IX.

Transfusion of the blood corpuscles of the dog.

Rabbit		No. 15. Body weight 1,400 gm.
Amount of blood transfused		8 cc. containing 2,050,000 corpuscles per cmm.
Red blood cell count per cmm.	One day before transf.	5,320,000
	One day after transf.	4,765,000

Rabbit			No. 15. Body weight 1,400 gm.
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	One day before transf.		63,200
	Time after transf.	4 m.	72,800
		8 m.	86,200
		15 m.	83,600

TABLE X.

Transfusion of the blood corpuscles of the hen.

Rabbit			No. 17. Body weight 2,690 gm.	No. 18. Body weight 3,050 gm.
Amount of blood transfused			9 cc. containing 3,385,000 corpuscles per cmm.	10 cc., cell count do
Red cell count per cmm.	Before transf.		6,397,000 (2 days) 6,775,000 (1 day)	7,725,000 (2 days) 7,490,000 (1 day)
	After transf.		6,070,000 (1 day)	7,130,000 (1 day)
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Before transf.		11,600 (2 days) 9,100 (1 day)	8,100 (2 days) 6,700 (1 day)
	Time after the transf.	5 m.	42,400	
		6 m.		81,600
		102 m.		18,600
		116 m.	7,000	
		230 m.	11,400	9,600

Counting the unagglutinated blood cells of rabbit No. 18 (6 minutes after the transfusion) the writer noticed under the microscope that the unagglutinated corpuscles consisted of three kinds of figures : i. e., small round cells, big elliptic cells with nucleus and small elliptic figures. The writer could ascertain by comparison of the size, form and the staining character that the last mentioned small elliptic figure differs nothing from nucleus devoid of protoplasm of the red blood cell of the hen. This seems to be an intermediate stage of disintegration which the transfused blood cells undergo. The writer traced the fate of the hen's blood, transfused into a rabbit, No. 19 and 20, a little more accurately. The result is shown in Table XI.

TABLE XI.

Rabbit			No. 19. Body weight 1, 850 gm.	No. 20. Body weight 1, 500 gm.
Amount of blood transfused			7.2 cc. containing 3, 847, 000 corpuscles per cmm.	6 cc., cell count do
Red cell count per cmm.	One day before transf.		6, 123, 000	7, 133, 000
	One day after transf.		5, 532, 000	6, 525, 000
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	One day before transf.		12, 300	8, 600
	Time after the transfusion	1 m.	h. 88, 400 n. 36, 000 r. 9, 200 total 133, 600	h. 37, 600 n. 138, 800 r. 8, 600 total 185, 000
		2.5 m.	h. 39, 200 n. 48, 400 r. 10, 800 total 98, 400	h. 9, 600 n. 95, 200 r. 10, 000 total 114, 800
		4 m.	h. 13, 600 n. 55, 600 r. 13, 200 total 82, 400	h. 2, 400 n. 108, 000 r. 10, 000 total 120, 400
		5.5 m.	h. 6, 400 n. 38, 800 r. 15, 600 total 60, 800	

Rabbit			No. 19. Body weight 1,850 gm.	No. 20. Body weight 1,500 gm.
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Time after the transfusion	16 m.	h. 0 n. 9,600 r. 16,000 total 25,600	h. 0 n. 18,400 r. 6,400 total 24,800
		30 m.	h. 0 n. 1,600 r. 12,000 total 13,600	h. 0 n. 10,400 r. 8,000 total 18,400

h. shows the number of intact blood corpuscles of the hen.
n. shows the number of nucleus freed from protoplasm.
r. shows the number of small round cells. (unagglutinated blood corpuscles of the rabbit.)

Time used in order to transfuse approximated in both cases 2 minutes. From Table XI one can presume that almost all of the hen's blood corpuscles undergo disintegration in a very short period of time, when transfused into a rabbit.

TABLE XII.

Transfusion of the blood corpuscles of the ox.

Rabbit			No. 21. Body weight 2,780 gm.	No. 22. Body weight 2,410 gm.
Amount of blood transfused			10 cc. containing 5,565,000 corpuscles per cmm.	9.5 cc., cell count do
Red cell count per cmm.	One day before transf.		6,470,000	5,715,000
	After transf.		5,830,000 (1 day) 5,475,000 (2 days) 4,975,000 (3 days) 5,050,000 (5 days)	4,870,000 (2 days) 5,115,000 (3 days)
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	One day before transf.		41,300	33,500
	Time after transf.	1.5 m.	353,000	
		5 m.		356,100
		6 m.	222,000	

Rabbit			No. 21. Body weight 2,780 gm.	No. 22. Body weight 2,410 gm.
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Time after transf.	1 h.	177,300	233,500
		25 h.	109,500	138,000
		49 h.	96,000	93,000
		53 h.		57,300
		73 h.	53,500	37,100
		96 h.	41,100	30,500
		114 h.	39,100	

As to the duration of time in which blood corpuscles of other species than its own survive Marfels and Maleschott (1856) arrived at the conclusion that the normal duration of their life must be very long since even after the lapse of months they could still recognize the transfused blood corpuscles of the sheep in the circulation of the frog. Brown-Sequard (1857) came to somewhat anomalous results, for while the blood cells of a dog or rabbit were recognizable in the blood of fowls even a month after the injection, the blood cells of fowls were lost entirely in the blood of dogs or rabbits within one hour after the injection. Panum has shown that the transfused foreign blood, though it might exercise a physiological function for a short period of time, disintegrates rapidly and is discharged from the circulation into urine and stool. Magendie also ascertained that the bird's blood transfused into mammalia will soon disappear from the circulation. H. Sachs (1903), injecting the ox's blood into the rabbit and using his own method found that the blood may sometimes disappear within 46 hours after the transfusion while it will quite often survive over 70–92 hours in the circulation. The disappearance seems to take place critically, for, when 35 cc. of blood was injected, 30 cc. of it was still recognizable 46 hours after the injection, whilst no trace of injected blood was found visible in 6 hours following. Studying the fate of the blood corpuscles of the ram and hen transfused into rabbits by means of cell count, by means of determination of hemoglobin content and by observation of various associated symptoms, T. Torii claims that the blood transfused will commence its disintegration immediately after the transfusion and disappear almost completely in 24 hours.

As will be seen it is found by the present study, that the blood of various species such as the guinea pig, rat, pig, hen, cat, horse, dog and ram disappears from the circulation in a very short period of time, while the blood corpuscles of the ox survive much longer (Table III-XII). The writer's observation on the latter corpuscles is practically identical with that of Sachs, differing only in that the disappearance takes place more litically than critically. The rapidity of the disappearance of the blood corpuscles of different species does not seem to depend on the distance of the phylogenitical order of the animals, nor on the presence or absence of the natural antibodies on the part of rabbits toward the transfused blood (Batelli has proved that the normal serum of the rabbit has not hemolysin against the blood cells of dog, cat and ox). Its exploitation awaits further investigation and study.

From the aforegoing the writer considers the ox's blood to be most suited for his purpose.

IV. Experiments.

Together with normal cell count, the number of the unagglutinated cells was estimated on the days preceding the transfusion. The blood used for experiments was defibrinated and freed from serum under the possible aseptic measure. The transfusion took place in each case from 10 to 12 hours after the withdrawal of the blood to be transfused. For the purity of the sodium chloride and other reagents used extreme care was employed. Into the control animal the blood washed and diluted with 0.9% saline solution in almost the same amount as used in the experiment was injected. Except the special manipulations given to the blood under experiment both the blood used for control and for experiments had undergone the same treatment. The same amount of blood as that to be transfused was previously withdrawn from the rabbit in order to avoid the artificial plethra. The time used both for withdrawal and transfusion approximated 1 to 3 minutes. The manipulations given to the blood under experiment did not go so far as to cause hemolysis. The numbers of the unagglutinated cells in 1 cmm. of circulating blood of the rabbit counted from time to time are tabulated under each experiment. The accompanying figure shows the rate of the remaining blood cells in the course of time. The percentage given in the figure is calculated by dividing the observed number of the remaining cells in 1 cmm. by the calculated number of the transfused blood cells in 1 cmm. of rabbit's blood in circulation. The estimate can easily be made when one knows the number of the blood corpuscles to be transfused and when the entire quantity of the blood of a rabbit is assumed to approximate 5.5% of it's body weight. The number of the blood corpuscles transfused was always estimated soon after the transfusion using the rest of the blood suspension for injection.

Experiment 1.

Effect of Ringer's and Lock's solution.

It is almost an acknowledged fact that the isotonic solution of the sodium chloride is not indifferent to the cell and therefore not to be regarded as physiological saline solution as the name signifies.

J. Loeb (1907) has shown by an experiment on the development of the eggs of the sea-urchin that the toxic action of the sodium chloride is neutralized by potassium and calcium contained in Ringer's and Lock's solution. F. H. Scott (1916) advances, however, that the isotonic solution of Ringer is in nowise indifferent to the blood corpuscles of the dog and ox as he examined the amount of nitrogen dissolving from blood corpuscles after a short period of time into the solution which was added to the blood. P. Rous and J. R. Turner (1916) also claim that Lock's solution (9.2 gm. NaCl, 0.05 gm. $NaHCO_3$, 0.1 gm. KCl and 0.1 gm. $CaCl_2$ in 1000 cc. water) is injurious to the blood corpuscles, but can be made indifferent by the addition of sugar. A. Chauffard and J. Huber (1917), on the other hand, comment that Ringer's solution with a 9 : 1000 concentration of chlorides is found to be a better preservative medium for blood corpuscles than an isotonic solution of sodium chloride alone.

In order to get a sufficient insight into this question both experiments in vitro (Table XIII) and in vivo (Table XIV and Fig. 1) were carried out.

The vitro experiment.

The influence of Ringer's solution on the stability of blood corpuscles was compared with that of the saline solution by using each of these solutions and of the solutions lacking one, two or three components of Ringer's or Lock's solution for the washing and dilution of the ox's blood corpuscles. The corpuscles were then kept in respective solution for 5 hours and their resistance against the immun-serum was tested. The test was conducted in a series of the test tubes with hemolytic system by allowing them to stand at the room temperature after incubating one hour and the appearance of hemolysis was observed. The hemolytic system in each test tube consisted of

1 cc. of 5% suspension of ox's blood.

1 cc. of rabbit's immun-serum for ox diluted to varied concentrations with 0.9% saline solution. The rabbit, from which the serum was obtained, was previously treated twice with ox's blood.

0.5 cc. of guinea pig's serum, 10 times diluted with 0.9% saline solution.

The result is given in the following Table XIII.

The vivo experiment.

In the vivo experiments Ringer's (9.0 gm. NaCl, 0.1 gm. $NaHCO_3$, 0.2 gm. KCl and 0.2 gm. $CaCl_2$ in 1000 cc. water) or Lock's solution (9.0 gm. NaCl, 0.2 gm. $NaHCO_3$, 0.42 gm. KCl, 0.24 gm. $CaCl_2$ and 1 gm. grape-sugar in 1000 cc. water) were used for the washing of the blood corpuscles and the latter were kept for 5 hours. The transfusion was then performed with such corpuscles diluted with 0.9% saline solution. The result obtained is compared with that of control. The result is shown in Table XIV.

TABLE XIII. (1)

The room temperature: 17.6°C.

Solution used for washing and diluting	(a) 0.9% sodium chloride											(b) 0.1 gm. $NaHCO_3$ in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride										
No. of test tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Dilution of immun-serum in the hemolytic system	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	0	in the same proportions as in (a)										
Result observed 2 hours	+++	++	++	++	+	±	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+	±	—	—	—	—	—
Result observed 12 hours	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	±	±	—	—	+++	+++	+++	+++	++	++	+	±	±	±	—

Solution used for washing and diluting	(c) 0.2 gm. KCl in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride											(d) 0.1 gm. $NaHCO_3$ and 0.2 gm. KCl in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride										
No. of test tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Dilution of immun-serum in the hemolytic system	in the same proportions as in (a)											in the same proportions as in (a)										
Result observed 2 hours	+++	+++	++	+	±	±	−	−	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+	±	−	−	−	−	−
Result observed 12 hours	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	±	±	−	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	±	±	−	−

TABLE XIII. (2)

The room temperature: 17°C.

Solution used for washing and diluting	(a) 0.9% sodium chloride								(b) 0.2 gm. $CaCl_2$ in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride								(c) 0.2 gm. $CaCl_2$ and 0.2 gm. KCl in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride							
No. of test tube	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilution of immun-serum in the hemolytic system	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	0	in the same proportions as in (a)															
Result observed 2 hours	+++	+++	++	±	−	−	−	−	+++	++	++	−	−	−	−	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−
Result observed 12 hours	+++	+++	++	+	+	−	−	−	+++	++	++	+	±	−	−	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−

Solution used for washing and diluting	(d) 0.2 gm. $CaCl_2$ and 0.1 gm. $NaHCO_3$ in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride								(e) 0.2 gm. $CaCl_2$, 0.2 gm. KCl and 0.1 gm. $NaHCO_3$ in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride								(f) 0.1 gm. $CaCl_2$, 0.1 gm. KCl and 0.05 gm. $NaHCO_3$ in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride							
No. of test tube	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilution of immun-serum in the hemolytic system	in the same proportions as in (a)								in the same proportions as in (a)															
Result observed 2 hours	+++	++	++	−	−	−	−	−	+++	++	+	−	−	−	−	−	+++	+++	++	−	−	−	−	−
Result observed 12 hours	+++	++	++	+	−	−	−	−	+++	++	+	±	−	−	−	−	+++	+++	++	+	±	−	−	−

TABLE XIII. (3)

The room temperature: 13°C.

Solution used for washing and diluting	(a) 0.9% sodium chloride								(b) 0.2 gm. $CaCl_2$, 0.2 gm. KCl and 0.1 gm. $NaHCO_3$ in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride							
No. of test tube	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilution of immun-serum in the hemolytic system	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	0	in the same proportions as in (a)							
Result observed 2 hours	++	++	++	+	+	±	−	−	++	++	++	+	+	−	−	−
Result observed 12 hours	+++	++	++	+	+	±	−	−	+++	++	++	+	+	−	−	−

Solution used for washing and diluting	(c) 0.2 gm. $CaCl_2$, 0.2 gm. KCl, 0.1 gm. $NaHCO_3$ and 1 gm. grape sugar in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride								(d) 0.2 gm. $CaCl_2$, 0.2 gm. KCl, 0.1 gm. $NaHCO_3$ and 3 gm. grape sugar in 1000 cc. of 0.9% sodium chloride							
No. of test tube	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilution of immun-serum in the hemolytic system	in the same proportions as in (a)								in the same proportions as in (a)							
Result observed 2 hours	++	++	++	+	±	±	−	−	++	++	++	+	±	−	−	−
Result observed 12 hours	+++	++	++	+	±	±	−	−	+++	++	++	+	±	−	−	−

TABLE XIV. (1) (s. Fig. 1. a.)

Effect of Ringer's solution.

Rabbit			No. 23. Body weight 2, 830 gm. Control	No. 24. Body weight 2, 700 gm.	No. 25. Body weight 3, 020 gm.
Amount of blood transfused			11 cc. containing 5, 700, 000 corpuscles per cmm.	11 cc. containing 5, 690, 000 corpuscles per cmm.	11 cc., cell count do
Red cell count per cmm.	One day before transf.		5, 280, 000	6, 783, 000	6, 205, 000
	One day after transf.		4, 815, 000	6, 273, 000	5, 805, 000
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Before transf.		25, 400	24, 200	17, 200
	Time after transfusion	58 m.	293, 000	179, 600	360, 000
		3.5 h.	273, 600	105, 000	217, 200
		7.5 h.	232, 000	108, 400	150, 000
		10 h.	196, 200	75, 200	125, 800
		15 h.	148, 400	53, 200	100, 600
		24 h.	33, 200	12, 800	31, 800
		27 h.	33, 600	12, 900	18, 900

TABLE XIV. (2) (s. Fig. 1. b.)

Effect of Lock's solution.

Rabbit		No. 26. Body weight 1, 950 gm. Control	No. 27. Body weight 1, 700 gm.	No. 28. Body weight 1, 680 gm.
Amount of blood transfused		12 cc. containing 6, 210, 000 corpuscles per cmm.	8.5 cc. containing 6, 425, 000 corpuscles per cmm.	12 cc., cell count do
Red cell count per cmm.	One day before transf.	7, 645, 000	5, 477, 000	7, 037, 000
	One day after transf.	6, 570, 000	5, 153, 000	6, 395, 000

	Rabbit		No. 26. Body weight 1,950 gm. Control	No. 27. Body weight 1,700 gm.	No. 28. Body weight 1680 gm.
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Before transf.		15,900	17,650	34,950
	Time after transfusion	5 m.	697,200	454,800	807,600
		11 h.		258,000	652,000
		12 h.	501,600		
		15½ h.	495,600	161,200	
		18 h.		141,200	516,000
		20 h.	446,400		
		37 h.	219,600	12,800	333,400
		40 h.		8,900	
		42 h.	148,000		
		61 h.	21,400	26,000	87,400
		63 h.	14,800		36,200

From this experiment it is evident that Ringer's or Lock's solution is in no respect better medium for preserving blood corpuscles, than an isotonic solution of sodium chloride alone.

Expreiment 2.

Effect of saline solution containing gelatin.

In view of avoiding the mechanical injury which might occur when blood corpuscles are washed with saline solution, P. Rous and J. R. Turner used a saline solution containing gelatin at the concentration of 1/8 to 1/4% as the washing medium. By such a procedure they claim not only a washing but also a vigorous shaking would give no injurious effect on the vitality of the red blood corpuscles. Experiment 2 was therefore done to ascertain the claim of the above workers by treating blood corpuscles with a saline solution containing gelatin in an amount of 1/4 per cent. The result is shown in the Table XV and Fig. 2.

TABLE XV. (s. Fig. 2.)

Effect of saline solution containing gelatin.

Rabbit			No. 29. Body weight 3,050 gm.	No. 30. Body weight 2,750 gm. Control
Amount of blood transfused			10 cc. containing 4,510,000 corpuscles per cmm.	12 cc. containing 5,630,000 corpuscles per cmm.
Red cell count per cmm.	One day before transf.		5,155,000	6,125,000
	After transf.		4,100,000 (2 days)	5,655,000 (1 day)
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Before transf.		14,800	17,800
	Time after transf.	10 m.	205,000	419,000
		1 h.	147,400	
		12 h.		268,000
		15 h.	124,400	
		16 h.		197,800
		17 h.	66,600	
		19 h.	62,400	158,800
		23 h.	39,600	
		38 h.	39,200	119,200
		40 h.	10,700	
		44 h.	14,000	81,000
		63 h.	18,500	19,000

As is shown in the table, there is no noticeable difference between the salt solution with gelatin and without it.

Experiment 3.

Effect of cholesterol.

It has been proved by the experiments of many workers, that the cholesterol acts as an antidote in the case of saponin hemolysis.

F. Ransom (1901) observed the fact that the cells freed from serum are less resistent to saponin than whole blood, and also that stroma fixes saponin to itself while laked hemoglobin is entirely lacking in this quality. The ether extract of blood serum and erythrocyte has the peculiarity of restraining saponin hemolysis. The further investigation showed that this extract consists chiefly of cholesterol. Ransom was able to find that the emulsion of pure cholesterol exerts the same action as the ether extract mentioned above. J. Pringsheim (1912) claims to have succeeded in checking paroxysmal hemoglobinuria by intra-muscular administration of cholesterol. However, as to its exact way of action he gives no definite explanation.

According to Laporte and Rouzaud (1920) one group of cholecystides shows hypercholesterinemia with normal resistance of red corpuscles while another group presents hypocholesterinemia with marked decrease of the said resistance. The antihemolytic action of cholesterol against the hemolytic action of digitonin, cobralysin etc. has also been proved by various workers. In order to know whether or not the previous treatment of red corpuscles with cholesterol shows any difference in the resistance of blood cells, the following experiment was carried out.

The cholesterol suspension (0.2%) in the saline solution was made according to the method given by Porges and Neugebauer (1908) and was used as washing fluid. After the washing the red corpuscles were kept in the same fluid for about 4 hours and then injection was made using 50% suspension in the 0.9% saline solution. The result, as shown in Table XVI and Fig. 3, does not show any noteworthy difference from the control.

TABLE XVI. (s. Fig. 3.)

Effect of cholesterol.

		Rabbit	No. 31. Body weight 2,200 gm.	No. 32. Body weight 3,170 gm.	No. 33. Body weight 2,700 gm. Control
		Amount of blood transfused	10 cc. containing 6,660,000 corpuscles per cmm.	10 cc. containing 7,290,000 corpuscles per cmm.	12 cc. containing 5,470,000 corpuscles per cmm.
Red cell count per cmm.		One day before transf.	6,600,000	5,490,000	6,570,000
		After transf.	6,275,000 (1 day)	4,420,000 (2 days)	5,865,000 (1 day)
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.		Before transf.	19,000	10,970	16,600
	Time after transf.	1 m.	567,600		
		10 m.			324,200
		15 m.		370,000	
		1 h.		324,000	
		1½ h.	424,000		
		12 h.			325,600
		17 h.	225,600	316,000	357,600
		20 h.	198,200	212,600	305,600
		23 h.	179,400	105,200	
		24 h.	156,200		180,600
		26 h.	101,200		
		39 h.		47,000	153,800
		41 h.	37,100	25,300	100,000
		48 h.	17,300	19,800	
		64 h.		11,600	20,800

Experiment 4.

Effect of gases.

In the literature one meets a few experiments on the effect of various gases on the vitality of blood corpuscles. In a study of combined action of hypotonic saline solution and saponin, F. Ottiker observed that the blood carrying CO_2 is extremely sensitive to the action of saponin. Ottiker added a certain amount of saponin into the blood, through which CO_2 was passed for 3 minutes and found the osmotic resistance to be markedly decreased. This, he thinks, is perhaps due to chemical change of cholesterol by the action of CO_2. By giving O_2 the blood charged with CO_2 recovers the decreased osmotic resistance to a certain degree but not to the normal state. Hamburger, differing from the above author, bases his explanation on the ion theory and is of the opinion that the decrease of the osmotic resistance in the blood charged with CO_2 is due to the giving out of CO_2'' and taking in of $2Cl'$, the consequent being the swelling of the blood corpuscles. Ottiker does not think this exploitation to be correct, because according to the ion theory the osmotic resistance must be reversible and therefore he himself maintains the idea that the change which occurs is a chemical one between CO_2 and some constituents of erythrocytes—the result being deminution of adsorbing faculty for hemoglobin. W. Patzschke (1920) comments as follows: CO_2 accentuates the action of inorganic blood toxin as much as 50 to 100 times. The higher the temperature, the sooner the reaction occurs. When human blood is used, anilin and nitrobenzene produce in vitro methemoglobin only after CO_2 is let in. It is therefore probable that a certain toxin maintains its action only in the venous blood circulation, and the blood corpuscles charged with CO_2 are labil and are easily damaged while the cells supplied with O_2 continually are resistant to the injury for a considerable period of time.

Y. Kawashima, studying the effects of various gases (N_2,

H_2, CO, CO_2 and O_2) on the glycolytic action of blood corpuscles, confirmed that the exclusion of O_2 does not interfere with the glycolytic action of the blood. The vitality of the blood corpuscles, therefore, was thought to be kept up by the intracellular oxygen. He observed also that CO has nothing to do with the glycolytic action whereas CO_2, when given to the extent of saturation, disturbs it markedly. The phenomenon was attributed to the acid reaction of CO_2. According to him the lessened glycolytic activity caused by the saturation of CO_2 recovers itself by O_2 supply and attains almost the same degree of activity as that of the control in which CO_2 was not acted from the beginning. He emphasizes also that oxygen itself has no peculiar augmenting action on glycolysis.

Thus the researches of workers differ more or less in their results.

Experiment 4 was carried out to ascertain whether or not various gases give any influence on the vitality of red corpuscles.

Through the blood suspension various gases—air minus CO_2, H_2, CO, CO_2, NO and SH_2—were introduced for 30 minutes and the blood, after 20 minutes' bubbling with air, was injected into a rabbit. The gases used were prepared afresh with extreme care for their purity. The control blood was treated with a current of air for 50 minutes. The cell count followed is shown in the Table XVII and Fig. 4.

TABLE XVII. (1) (s. Fig. 4. a.)

Effect of gases.

Rabbit	No. 34. Body weight 2,710 gm. Control	No. 35. Body weight 2,710 gm.	No. 36. Body weight 2,810 gm.
Gases introduced into blood suspension	Air	Air minus CO_2	H_2
Amount of blood transfused	12 cc. containing 5,630,000 corpuscles per cmm.	12 cc., cell count, 5,415,000 per cmm.	12 cc., cell count, 5,590,000 per cmm.

Rabbit			No. 34. Body weight 2,710 gm. Control	No. 35. Body weight 2,710 gm.	No. 36. Body weight 2,810 gm.
Red cell count per cmm.	Before transf.		5,188,000	7,532,000	6,215,000
	One day after transf.		4,375,000	6,710,000	5,805,000
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Before transf.		15,400	16,300	24,400
	Time after transf.	10 m.	421,000	365,600	412,000
		16 h.	332,600	341,000	182,800
		17 h.	314,400		
		18 h.			167,600
		19 h.	258,800	305,600	
		23 h.	201,600	196,400	54,000
		34 h.		162,800	40,400
		38 h.	153,200		
		42 h.	112,000	100,000	22,000
		62 h.	19,000	21,000	17,700

TABLE XVII. (2) (s. Fig. 4. b.)

Rabbit		No. 37. Body weight 2,040 gm. Control	No. 38. Body weight 2,500 gm.
Gases introduced into blood suspension		Air	CO
Amount of blood transfused		9 cc. containing 4,420,000 corpuscles per cmm.	10 cc., cell count 4,340,000 per cmm.
Red cell count per cmm.	Before transf.	5,210,000	6,135,000
	One day after transf.	4,805,000	5,440,000

Rabbit			No. 37. Body weight 2,040 gm. Control	No. 38. Body weight 2,500 gm.
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Before transf.		19,650	14,150
	Time after transf.	25 m.		128,200
		40 m.	364,600	
		10 h.	197,000	56,200
		14 h.		37,200
		16 h.	98,200	18,200
		18 h.	89,200	17,000
		20 h.	38.800	
		24 h.	40,800	16,100
		36 h.		13,400
		38 h.	19,800	

TABLE XVII. (3) (s. Fig. 4. c.)

Rabbit		No. 39. Body weight 2,480 gm. Control	No. 40. Body weight 3,070 gm.	No. 41. Body weight 3,030 gm.	No. 42. Body weight 2,090 gm.
Gases introduced into blood suspension		Air	CO_2	NO	SH_2
Amount of blood transfused		9.5 cc., cell count 5,495,000 corpuscles per cmm.	10.5 cc., cell count 5,430,000 per cmm.	9.5 cc., cell count 4,970,000 per cmm.	10 cc., cell count 4,500,000 per cmm.
Red cell count per cmm.	Before transf.	6,810,000	7,150,000	7,035,000	6,760,000
	Three days after transf.	5,925,000	6,025,000	5,915,000	5,455,000
	Before transf.	9,600	8,700	7,830	7,450
	1 m.	360,000	332,000	273,600	

Robbit			No. 40. Body weight 2,480 gm. Control	No. 40. Body weight 3,070 gm.	No. 41. Body weight 3,030 gm.	No. 42. Body weight 2,090 gm.
Number of the unagglutinated corpuscles per cmm.	Time after transf.	8 m.				241,000
		10 h.			107,200	104,200
		12 h.	305,600	282,800		35,600
		14 h.	228,000	278,800	95,200	14,600
		18 h.	224,800	248,000	66,800	11,300
		32 h.		198,600	37,600	7,700
		34 h.	244,800			
		38 h.		187,000	25,400	
		40 h.	162,800	182,600		9,300
		42 h.	143,200		23,600	
		58 h.	104,400	98,400	11,200	
		66 h.	64,400	75,800		
		83 h.	7,200	15,000	12,200	

As it is shown in the table the exclusion of oxygen seems to weaken the vitality of blood corpuscles. CO_2 shows no marked influence on the vitality of blood corpuscles whereas gases which combine firmly with hemoglobin such as NO, CO, H_2S are injurious to a considerable degree.

Experiment 5.

Effect of hypotonic saline solution.

The effect of hypotonic saline solution on the resistance of blood corpuscles in the normal and pathological conditions has been studied by various workers. The writer himself made a preliminary experiment in test tube using the ox's blood kept 9 hours in a refrigerator and hypotonic saline solution in varied concentrations. The result is shown in Table XVIII.

TABLE XVIII.

Hemolysis by hypotonic saline solution in vitro.

The room temperature 18°C.

No. of test tube			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amount of Aq. dest. (cc.)			0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8
Amount of 0.9% sodium chloride (cc.)			1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
10% blood suspension (cc.)			0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
End percentage of sodium chloride			0.81	0.72	0.63	0.54	0.45	0.36	0.27	0.18	0.09
Result	10 m.	after preparing the mixture	—	—	—	±	++	+++	+++	+++	+++
	1 h.		—	—	—	+	+++	+++	+++	+++	+++
	12 h.		—	—	±	++	+++	+++	+++	+++	+++
	24 h.		—	±	±	++	+++	+++	+++	+++	+++

It is confirmed by this experiment that the minimum concentration resistent against hemolysis lies at 0.54% of saline solution at the room temperature of 18°C. This concentration is slightly higher than that given by former researches, probably because the blood used in my experiment has been kept 9 hours in a refrigerator.

The concentration of hypotonic salt solution had been selected therefore as 0.65%, which itself would not cause hemolysis in vitro. The blood was treated for 4 hours with this solution and the injection and counting of the unagglutinated blood cell were conducted as usual. The result observed is shown in Table XIX and Fig. 5.

TABLE XIX. (s. Fig. 5)

Effect of hypotonic (0.65%) saline solution.

Rabbit			No. 43. Body weight 1,950 gm. Control	No. 44. Body weight 1,750 gm.	No. 45. Body weight 1,670 gm.
Amount of blood transfused			13 cc., cell count 6,210,000 corpuscles per cmm.	12 cc., cell count 6,085,000 per cmm.	11 cc., cell count do.
Red cell count per cmm.	Before transf.		6,570,000	7,550,000	7,680,000
	One day after transf.		6,095,000	7,110,000	7,218,000
Number of the unagglutinated corpuscles per cmm.	Before transf.		15,500	55,500	19,000
	Time after transfusion	4 m.	697,200	750,000	709,200
		12 h.	501,000	679,200	696,000
		15 h.	495,600	651,600	667,600
		38 h.	219,600	376,000	370,400
		40 h.	148,000	372,800	381,200
		50 h.	75,300	179,600	184,500
		61 h.	21,400	42,100	136,200
		64 h.	14,800	39,800	32,400

Thus the result shows that there is no visible difference in the vitality of blood cells between the cells treated with isotonic and hypotonic saline solution so far as the resistance in vitro is not questioned.

Experiment 6.

Effect of hydrogen ion concentration.

There are many researches carried out on the effect of acid and alkali on the resistance of blood corpuscles. The work of L. Michaelis and D. Takahashi is especially to be mentioned. These workers used a mixture of acetic acid and sodium aceticum and tried to find out the effect of varied hydrogen ion concentration on the resistance of the bloods of the ram, horse, mouse and pigeon. The conclusion is abstracted as follows :

" Frische Blutkörperchen bleiben also bis herab zur Wasserstoffionenkonzentration von $1{,}0\cdot10^{-5}$ auch beim längerem Aufenthalt intakt, während sie bei jeder höheren Wasserstoffionenkonzentration vollkommen gelöst werden. Bei manchen Blutarten (Maus, Taube) ist die Grenze zwischen kompleter und negativer Hämolyse scharf, während bei anderen (Hammel) bei 24 stündigem Aufenthalt eine partielle Hämolyse noch bei $[H^{\bullet}] < 1\cdot10^{-5}$ eintritt. Von $0{,}7\cdot10^{-5}$ an, zum mindesten aber von $0{,}4\cdot10^{-5}$ an abwärts tritt praktisch überhaupt keine Hämolyse mehr ein."

The writer of the present article prepared solutions having various grades of hydrogen ion concentration by means of the phosphate mixture and added in this an appropriate amount of sodium chloride so that their osmotic pressure becomes isotonic. To these a certain quantity of blood suspension was mixed in the test tubes and hemolysis which might ensue, was carefully watched at 2nd, 12th and 24th hours. It was thus found out that the hemolysis was not observed at pH 5.2–7.8. Animal experiment was, therefore, carried out by injecting the blood suspension treated with pH 5.2 and 7.8 for 4 hours and the result was compared with that of control in which blood treated with pH 7.1 was used (Table XX and Fig. 6).

TABLE XX. (s. Fig. 6.)

Effect of hydrogen ion concentration.

Rabbit			No. 46. Body weight 2,920 gm. Control	No. 47. Body weight 2,840 gm.	No. 48. Body wetght 2,900 gm.	No. 49. Body weight 2,700 gm.
Amount of blood transfused			10 cc., cell count 4,460,000 corpuscles per cmm.	10 cc., cell count 4,810,000 per cmm.	amount and cell count do.	11 cc., cell count 5,310,000 corpuscles per cmm.
Red cell count per cmm.	One day before transf.		7,720,000	7,290,000	6,370,000	7,200,000
	Two days after transf.		7,220,000	6,500,000	5,410,000	7,085,000
pH of preserving fluid			7.1	5.2	5.2	7.8
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm.	Before transf.		31,400	31,400	33,400	25,600
	Time after transf.	1 h.	230,800	236,800	271,200	362,800
		8 h.	197,400	88,400	102,800	239,600
		14 h.	125,000	83,800	46,800	201,000
		19 h.	100,000	54,000	39.800	204,600
		27 h.	98,000	57,600	46,000	
		35 h.		29,800	39,800	196,400
		40 h.	27,600			59,800
		60 h.				38,600

Thus one sees the hydrogen ion concentration influences the vitality of the blood corpuscles even when in the test tube no morphological alteration could be observed by microscopical examination ; i. e., the blood treated with pH 7.8 remains in the circulation longer than that of control while the same treated with pH 5.2 disappears from the circulation considerably faster than the control.

Experiment 7.

Effect of dyes.

The effect of dyes having photodynamic character on the hemolysis has been studied by H. V. Tappeiner (1909), G. Sacharow and H. Sachs (1905), A. Jodlbauer and E. Haffner (1921) and others. So far as the writer was able to search in the literature there are only a few experiments on the effect of gentian violet on the cells of higher animals. Two noteworthy works are here to be quoted. The one is made by G. Russell (1914), who examined the effect of gentian violet on adult and embryonic frog tissue growing in vitro and got the result that both the embryonic and adult tissue of the frog will grow in vitro in the presence of gentian violet of a far stronger concentration than that necessary to kill many kinds of bacteria. In the experiments, for example, successful tissue growth was obtained when gentian violet 1 to 20,000 was used. Another work to be quoted here is the study made by J. W. Churchman and L. F. Herz (1913). With the purpose of determining the toxicity of gentian violet and its fate in the animal body, they injected the dye in the ear vein of rabbits and obtained the result that the dye seemed in one group of animals to be absolutely without effect, even when injected in enormous doses (ten cubic centimeter of a 1 to 200 solution), while in another group of experiments, the animals died within a minute or so after the injection without showing any particular change in the autopsy aside from the staining of the tissues.

In view of determining the effect of dyes on the vitality of erythrocytes the writer has made the experiment with gentian violet (basic dye) and with acid fuchsin (acid dye). As a preliminary test isotonic solution of varied concentrations of the dyes mentioned were prepared to which a certain amount of blood suspension (known number) was added and left under the diffuse light of the room. It was thus found out that 0.2% solution of gentian violet and 0.5% solution of acid fuchsin did not show hemolysis in an hour as tested by protein reaction of supernatant fluid as well as by cell count.

The blood corpuscles placed under the influence of the above dyes for 45 minutes was then centrifuged and washed with 0.9% saline solution and 50% suspension was made with the same saline solution. The suspension thus obtained was injected into the rabbit and the agglutination test was made in regular intervals and the result is shown in Table XXI.

TABLE XXI. (1) (s. Fig. 7. a.)

Effect of dyes.

Rabbit			No. 50. Body weight 2,700 gm.	No. 51. Body weight 3,160 gm.	No. 52. Body weight 3,200 gm. Control
Dye used			Gentian violet (0.2%)	Acid fuchsin (0.5%)	
Amount of blood transfused			9 cc., cell count 5,840,000 corpuscles per cmm.	9 cc., cell count 4,637,000 per cmm.	10 cc., cell count 6,425,000 per cmm.
Red cell count per cmm.	Before transf.		5,870,000	6,860,000	6,466,000
	After transf.		5,430,000	6,275,000	5,870,000
	Before transf.		13,100	16,900	10,630
		2 m.	344,000	240,000	
		5 m.			371,600

Rabbit		No. 50. Body weight 2, 700 gm.	No. 51. Body weight 3, 160 gm.	No. 52. Body weight 3, 200 gm. Control
Number of the unagglutinated blood corpuscles per cmm. Time after transf.	2 h.	280, 400	144, 000	293, 600
	9 h.	195, 200	80, 800	285, 200
	15 h.		76, 800	211, 200
	16 h.	119, 600		
	19 h.	73, 200	52, 400	164, 400
	36 h.	49, 400	24, 400	129, 600
	42 h.	26, 200	18, 900	77, 600
	60 h.	14, 000	7, 700	38, 200
	65 h.			13, 200

In order to avoid the action of hydrogen ion concentration of these staining solutions dyes were dissolved in phosphate mixture (pH 7.1) and the experiment was repeated, the blood being kept 3 hours in the solution (Table XXII).

Both results show that the blood treated with gentian violet or acid fuchsin will disintegrate rapidly in the animal body even though these staining solutions will not themselves affect the blood corpuscles morphologically.

TABLE XXII. (2).

Effect of dyes at pH 7.1. (s. Fig. 7. b.)

Rabbit	No. 53. Body weight 1, 720 gm.	No, 54. Body weight 1, 400 gm.	No. 55. Body weight 1, 620 gm. Control
Dyes used	Gentian violet (0.2%)	Acid fuchsin (0.5%)	
Amount of blood transfused	8.9 cc. containing 2, 030, 000 corpuscles per cmm.	8.2 cc., cell count 3, 230, 000 per cmm.	7.9 cc., cell count 5, 855, 000 per cmm.

Rabbit			No. 53. Body weight 1,720 gm.	No. 54. Body weight 1,400 gm.	No. 55. Body weight 1,620 gm. Control
Red cell count per cmm.	Before transf.		5,375,000	7,290,000	5,520,000
	After transf.		4,940,000	6,358,000	5,070,000
Number of the unagglutinated corpuscles per cmm.	Before transf.		36,800	20,600	16,000
	Time after transf.	5 m.	25,400	353,000	461,600
		4 h.	35,800	270,000	421,000
		6 h.	44,400		
		7 h.		68,800	
		11 h.			308,800
		13 h.	28,400	38,400	
		16 h.			260,400
		18 h.		42,600	
		32 h.	21,000		112,200
		36 h.		21,300	78,200
		58 h.			18,500

V. CONCLUSION.

1. The method used in this work for following the fate of the transfused foreign blood seems more accurate and convenient than the methods proposed by the former workers.

2. The writer tried to find out the altered vitality of the transfused red blood corpuscles by means of tracing the duration of time in which transfused blood cells remain in the recipient's circulation.

3. Blood of various species as the guinea pig, horse, pig,

rat, cat, ram and hen, transfused into the rabbit disappears from the circulation in a short period of time (4 to 30 minutes), while in case of the ox's blood the injected blood corpuscles can be found 38 to 73 hours after the transfusion in the recipient's circulation.

4. Various treatments given to the transfusing blood will alter the duration of the time in which the blood remains in the recipient's body :

a) Ringer's or Lock's solution is not a better medium for preserving blood corpuscles than isotonic saline solution.

b) Gelatin dissolved in isotonic saline solution (1/8–1/4%) does not protect the mechanical injury which might occur by washing.

c) Isotonic solution containing fine suspension of cholesterol executes no noteworthy influence on the vitality of blood corpuscles.

d) Exclusion of oxygen from blood-suspension by means of saturation with various gases (H_2, CO_2, CO, NO, SH_2) for a certain length of time seems to injure the vitality of the blood corpuscles in varied degrees ; i. e., CO, NO, SH_2 (gases combine firmly with hemoglobin) more intensive than H_2 and CO_2.

e) Hypotonic saline solution (0.65%) causes no injurious effect on the vitality of blood corpuscles.

f) The influence of pH on the vitality of blood corpuscles is conspicuous in such a measure that isotonic solution with pH 7.8 is more favorable and that pH 5.2 less favorable than pH 7.1 which is approximately of the same alkalinity as that of normal blood.

g) Dyes such as gentian violet and acid fuchsin show marked injurious effect on the vitality of transfused blood even when, tested in vitro, there is no noticeable change by microscopical examination.

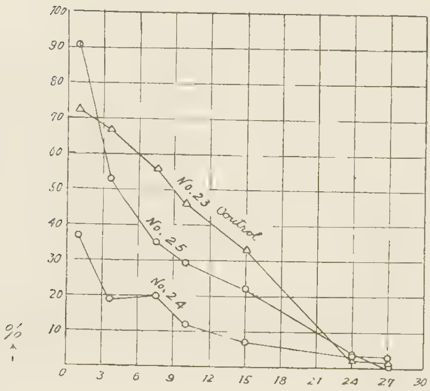
The writer is greatly indebted to Prof. Dr. S. Kakiuchi whose instructions and guidance have enabled to complete this work.

REFERENCES.

Ashby, W. (1919): Journ. exp. Med., **29**, 265.
Belfanthi, L. and Carbone, T. (1898): referred in Maly's Jahresbericht, 1899.
Brummer, G. (1913): Maly's Jahresb., 173.
Chauffard, A. and Huber, J. (1917): referred in Chem. Abstract, 1918.
Churchman, J. (1913): Journ. exp. Med., **18**, 579.
Coca. F. (1909): Virch. Arch., **196**, 92.
Ehrlich and Morgenroth (1899): Berl. kl. W., **36**, Nr. 1, 6.
Gottlieb, R. and Lefmann, G. (1907): Med. Klinik., 3 Jahrgang, Nr. 15, 414.
Hunter, W. (1884–1886): Proc. Roy. Soc. Edinburgh, **13**, 849.
Jodlbauer, A. and Haffner, F. (1921): Biochem. Zeitschr., **118**, 150.
Kambe, H. and Komiya, E. (1920): Am. J. of Physiology, **53**, No. 1.
Kawashima, Y. (1922): Journ. of Biochem., **2**, 131.
Krasny, J. (1913): F. Haemat., **16**, 353.
Laporte and Rouzaud (1920): Chem. Zentralbl., **3**, 111.
Loeb, J. (1907): Biochem. Zeitschr., **2**, 81.
Michaelis, L. und Takahashi, D. (1910): Biochem. Zeitschr., **29**, 439.
Ottiker, F. (1914): F. Haemat., **18**, 117.
Panum (1863): Virch. Arch., **27**, 240.
Patzschke, W. (1920): Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. phys. Chem., **109**, 1.
Ponfick (1873): Virch. Arch., **62**, 273.
Porges and Neugebauer (1908): Biochem. Zeitschr., **7**, 152.
Pringsheim, J. (1912): Münch. Med. Wochenschr., Nr. **32**, 1757.
Ranson, F. (1901): Deutsche Med. W., 27 Jahrg., Nr. 13, 194.
Rous, P. and Turner, J. R. (1916): J. exp. Med., **23**, 219, 239.
Russell, D. G. (1914): Journ. exp. Med., **20**, 545.
Sacharow, G. and Sachs, H. (1905): M. Med. W., 52 Jahrg., Nr. 7, 297.
Sachs, H. (1903): Engelmann's Archiv, physiolog. Abt., 494.
Sanford, A. H. (1916): J. Am. Med. Ass., **70**, 1221.
Scott, F. H. (1916): Maly's Jahresbericht, 98.
v. Tappeiner, H. (1909): Ergebnis d. Physiol, **8**, Jahrgang, 698.
Torri, T. (1921): Nippon Gekagakkwai Zasshi, 20–22.
Watanabe, M. and Harada, Y. (1921): Mitteil. d. Med. Ges. zu Tokyo, **36**, Nr. 6.

Fig. 1. (a).

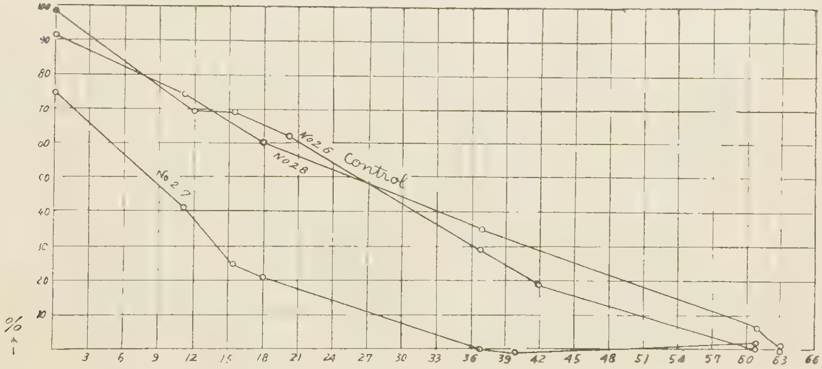
Effect of Ringer's solution.



→time in hours.

Fig. 1. (b).

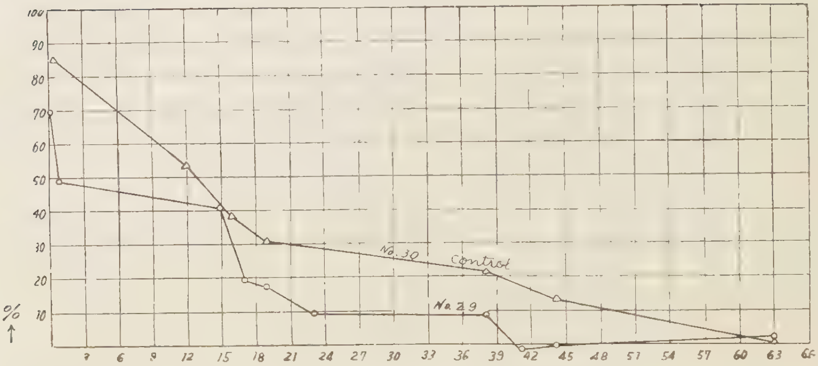
Effect of Lock's solution.



→time in hours.

Fig. 2.

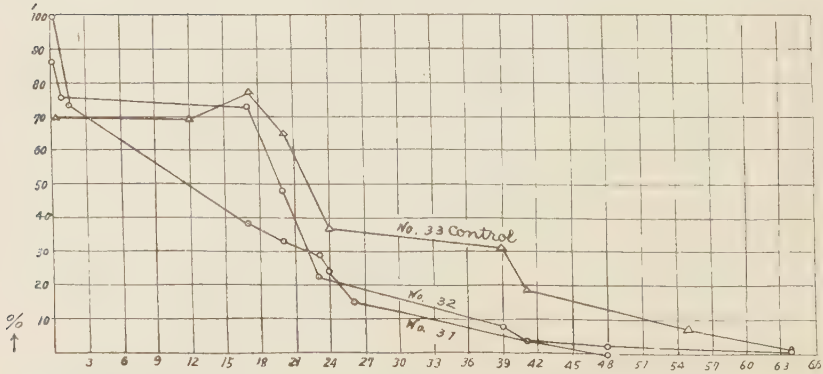
Effect of saline solution containing gelatin.



→time in hours.

Fig. 3.

Effect of cholesterol.



→time in hours.

Fig. 4. (a).

Effect of gases.

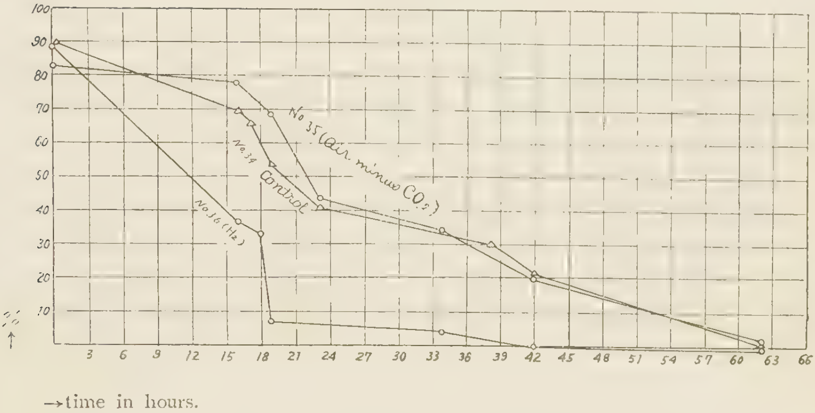


Fig. 4. (b).

Effect of gases.

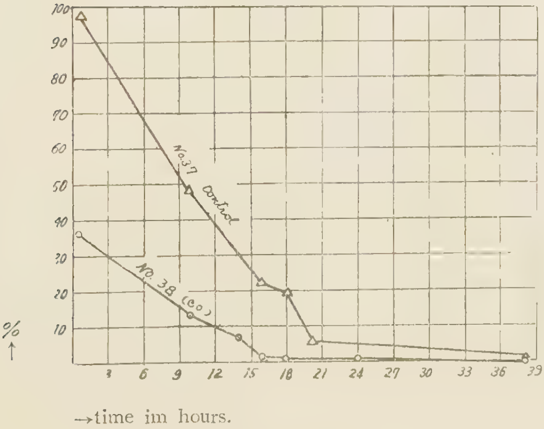
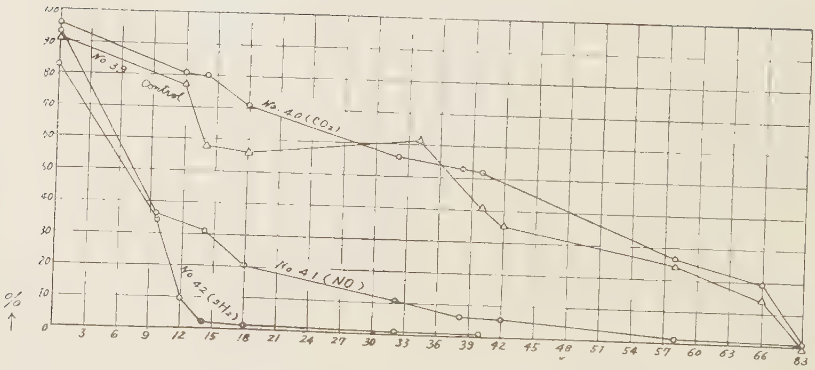


Fig. 4. (c).

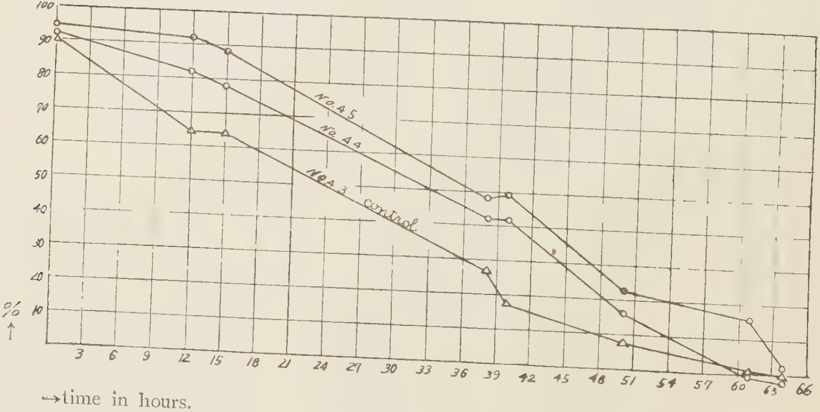
Effect of gases.



→time in hours.

Fig. 5.

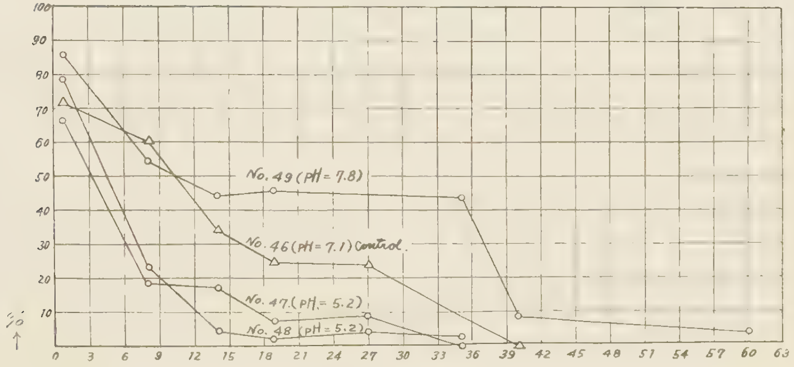
Effect of hypotonic (0.65%) saline solution.



→time in hours.

Fig. 6.

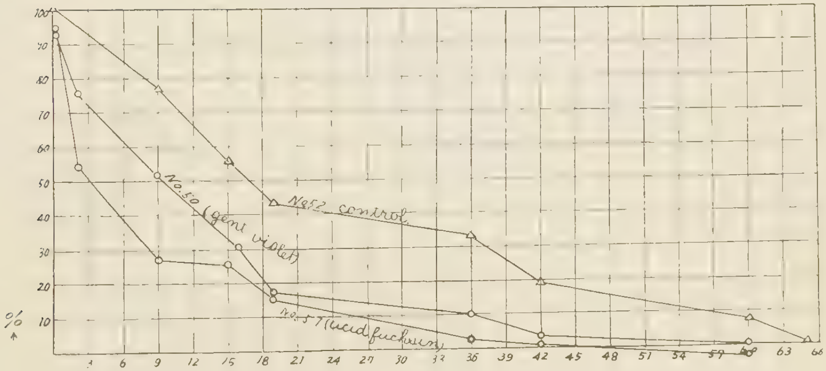
Effect of hydrogen ion concentration.



→time in hours.

Fig. 7. (a).

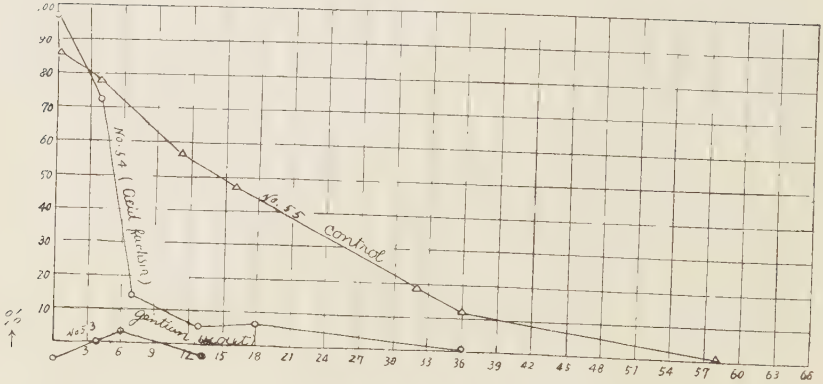
Effect of dyes.



→time in hours.

Fig. 7. (b).

Effect of dyes at pH. 7.1.



→time in hours.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DES GLIADINS.

VON

ITSUO ETO.

(*Aus dem Medizinisch-chemischen Institut, Kaiserliche Universität zu Tokyo: Vorstand Prof. Dr. S. Kakiuchi.*)

(Eingegangen am 15 August, 1923.)

I. EINLEITUNG.

Bezüglich der Bearbeitung des Gliadins fehlt es nicht an mancher Literatur. Es ist nämlich sein Gehalt an verschiedenen Aminosäuren nach der E. Fischer schen Estermethode ermittelt worden, ebenso wurde die Stickstoffverteilung nach der van Slykeschen Methode bestimmt. Charakteristisch ist es dabei, dass das Gliadin an Prolin und Säureamid reich ist, wie es bei den anderen Eiweisskörpern nicht der Fall ist.

Osborne und Nolan (1920) behaupteten nach ihrem Experiment ferner, dass, wenn das Gliadin mit 1%iger Salzsäurelösung 2 Stunden lang gekocht wurde, fast dieselbe Menge Ammoniak in Freiheit gesetzt werde, als wenn es mit 20%iger Salzsäurelösung 24 Stunden gekocht werde. In neuester Zeit (1922) fand H. B. Vickery, dass das Gliadin, in einer sehr schwachen Säure oder im Alkali gesotten, eine grosse Menge Ammoniak abspaltete und dass sich der nach dem van Slykeschen Verfahren bestimmbare Aminostickstoff vermehrte. Ferner wurde von ihm gesehen, dass, wenn das Gliadin von neuem mit einer starken Säure oder Alkali gekocht wird, recht schnell der ganze oder fast ganze Teil des Ammoniaks in Freiheit gesetzt wird.

Wie aus der Beschreibung Osborne und Strauss' (1921) klar hervorgeht, ist Gliadin entgegen den anderen Eiweisskörpern im verdünnten Alkohol (dessen optimales Verhältnis zu Wasser nicht weit von 70% entfernt ist) am leichtesten löslich, dagegen im Wasser fast unlöslich. Freie Säuren oder Alkalien enthaltendes Wasser aber löst es leicht. Von der Meinung ausgehend, dass zwischen der Löslichkeit, dem Verhalten gegen Ferment, der biologischen Reaktion einerseits und der charakteristischen chemischen Zusammensetzung andererseits irgend eine Beziehung vorhanden seine muss, hat sich der Verfasser der vorliegenden Abhandlung zur Aufklärung dieser Fragen mit dem Studium derselben befasst.

II. Darstellung von Gliadin aus Weizengluten.

Das als Material benutzte Gliadin habe ich nach dem Verfahren von Th. B. Osborne und I. F. Harries (1906) aus Weizengluten dargestellt. Das Gliadin, dessen Stickstoffgehalt 16.8% und Aschenbestandteile 0.17% sind, wurde im Trockenschrank bei 110°C bis zum gewichtkonstanten Zustande getrocknet. Der Stickstoffgehalt des wasserfreien Gliadins ist 17.2%.

III. Löslichkeit.

Experiment 1.

a) Löslichkeitsgrad in Alkohol von 80 und 90% bei 30°C.

Etwa 20 ccm Alkohol wurde im Erlenmeyerschen Kolben unter Hinzufügung von ca. 0.5 g Gliadin fest zugepfropft eine Nacht stehen gelassen. Bei 4 Stunden dauerndem Schütteln desselben im Thermostat bei 30°C setzte sich der grösste Teil des Überschusses des Gliadins am Boden des Kolbens. Nachdem das Gemisch eine Zeit lang im Thermostat stehen gelassen wurde, wurde 2 ccm der über dem Bodensatz befindlichen Gliadinlösung durch eine Pipette unter Einschaltung des Watte-Filters eingesogen und der Stickstoffgehalt nach der mikrochemischen Methode von Folin-Farmer (1912) bestimmt.

b) Löslichkeitsgrad in Alkohol von 50 und 40% bei 30°C.

Da bei der Löslichkeitsbestimmung mit Alkohol von 50% und 40% der schwer lösliche Teil als feine Emulsion nicht klar filtriert werden konnte, wurde die Löslichkeit in folgender Weise bestimmt.

Eine bestimmte Menge Gliadin wurde eine Nacht in einer bestimmten unzureichenden Menge Alkohol gelassen und im Thermostat bei 30°C 4 Stunden lang geschüttelt. Nun wurde je 1–2 ccm Alkohol mit nachfolgender 3stündiger Schüttelung hinzugefügt, bis die Lösung fast klar war, so dass sie mit blossen Augen von destilliertem Wasser nicht unterschieden werden konnte.

c) Löslichkeitsgrad in Alkohol von 70 und 60% bei 30°C.

Wenn das Gliadin auf die oben erwähnte Weise im Thermostat bei 30°C mit Alkohol von 70% oder 60% geschüttelt wird, löst es sich in beliebigem Verhältnis, indem es eine klebrige Masse wie „Mizuame" bildet. Die Löslichkeit hier ist daher unendlich zu nennen.

Die durch obiges Experiment erzielten Ergebnisse werden im folgenden tabellarisch angegeben.

TABELLE I.

Löslichkeitsgrad des Gliadins in verschiedenprozentigem Alkohol bei 30°C.

Prozent des Alkohols	Prozent des in Alkohol gelösten Gliadins
90	0.39
80	1.06
70	unendlich
60	„
50	1.12
40	0.54

In den nachstehenden auf die Löslichkeit bezüglichen Experimenten wurde der Stickstoffgehalt des Gliadins als 17.2%, nämlich als wasserfreies Gliadin berechnet.

Experiment 2.

Löslichkeitsgrad in Säuren und Alkalien von verschiedenen Konzentrationen bei der Zimmertemperatur (10–11°C).

Da die beim Schütteln unter überschüssiger Hinzufügung des Gliadins zu Salzsäure oder Natronlauge entstandene Trübung des darin enthaltenen Wassers auch nicht klar filtriert werden konnte, stellte ich eine konzentrierte Gliadinlösung in Alkohol wie in der nachstehenden Tabelle angegeben dar und setzte eine bestimmte Menge davon zur sauren oder alkalischen Lösung ein.

TABELLE II.

Prozent des Gliadins	Milligram des in 1 gtt. enthaltenen Gliadins
%	mg.
20	3.42
10	1.71
5	0.85
3	0.51
2	0.35
1	0.17
0.5	0.08

Der Gliadingehalt jedes Tropfens der verschieden konzentrierten Lösung wurde jedesmal aus seinem Stickstoffgehalt, welcher nach der Folin-Farmerschen mikrochemischen Methode bestimmt worden war, festgestellt. Der Grund, weshalb ich den Gliadingehalt jedes Tropfens besonders bestimmte, ist darin zu suchen, dass ich fürchtete, dass, da nach den Konzentrationen des Gliadins die Viskosität verschieden ist, auch das Volum jedes einzelnen Tropfens verschieden sein könnte.

Alsdann nahm ich je 5 ccm Salzsäure- und Natronlaugelösung von verschiedenen Konzentrationen bei der Zimmertemperatur von 10–11°C in Reagenzgläser und tropfte darin die geeignete dicke alkoholische Gliadinlösung, bis eine recht geringe Trübung entstand. Die Bestimmung des Gliadingehalts erfolgte durch Berechnung der Tropfen. Das Ergebnis ist aus der nachstehenden Tabelle klar zu ersehen.

TABELLE III (Siehe Fig. 1).

Löslichkeitsgrad des Gliadins in Salzsäure- und Natronlaugelösungen bei Zimmertemperatur (10–11°C).

Konzentration der Salzsäure oder Natronlauge	Prozent des in HCl-lösung gelösten Gliadins	Prozent des in NaOH-lösung gelösten Gliadins
N/2		0.01
N/10	fast unlöslich	0.31
N/20	0.01	0.41
N/40	0.15	0.92
N/80	0.24	0.39
N/160	0.48	0.27
N/320	0.70	0.19
N/640	0.33	0.08
N/1280	0.24	0.03
N/2560	0.15	fast unlöslich
N/5120	0.07	fast unlöslich

Experiment 3.

Nach dem im Experiment 2 erwähnten Verfahren wurde die Löslichkeit des Gliadins in den sehr schwachen Salzsäurebezw. Natronlaugelösungen von verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Darauf wurde pH der betreffenden Lösungen mit Indikatorenmethode festgestellt, wie die Tabelle IV zeigt.

TABELLE IV (Siehe Fig. 2).

pH in der gesättigten Gliadinlösung bei Zimmertemperatur (14-15°C.)

pH	Prozent des Gliadins
4.1	0.089
4.5	0.040
4.7	0.021
5.4	0.003
9.5	0.003
9.9	0.005
10.3	0.014

Fig. 1.

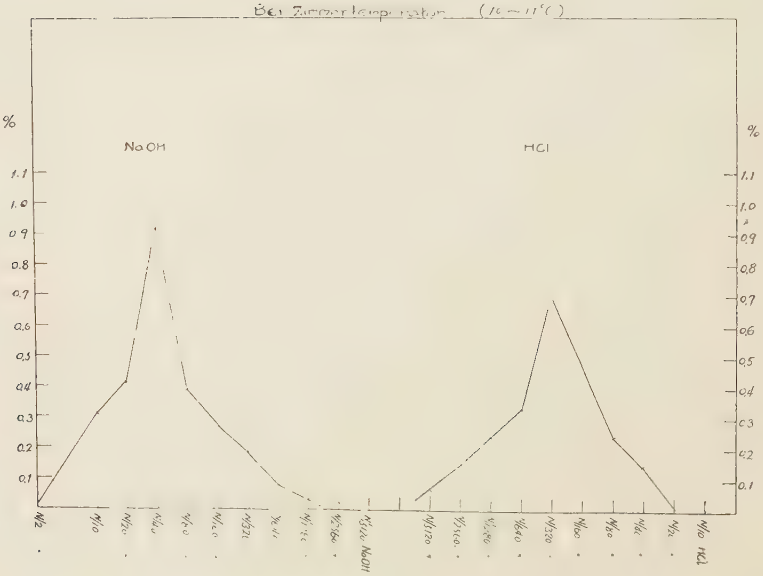
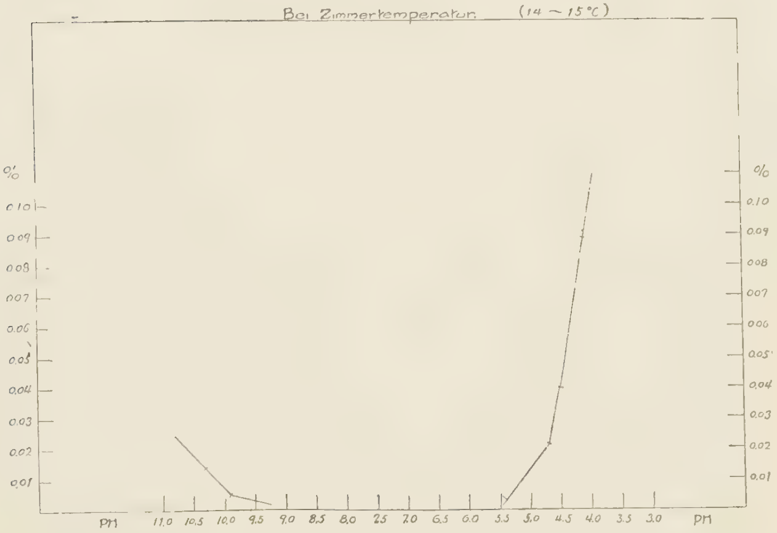


Fig. 2.



Experiment 4.

Bestimmung des isoelektrischen Punktes.

Zunächst brachte ich 20 ccm Salzsäure- und Natronlaugelösung von verschiedenen Konzentrationen in Reagenzgläser, tropfte darauf je 5 Tropfen 10%iger Gliadinlösung in Alkohol ein, schloss die Gläser mit Gummipfropfen und liess sie lange stehen. Das Reagenzglas, in welchem die Niederschläge sich am raschesten zu Boden setzen, wurde ausgewählt und der pH-Wert der oberen, klaren Flüssigkeit wurde mit der Indikatorenmethode als 6.6 festgestellt.

Bei dem mit KH_2PO_4-NaOH-Gemisch als Puffer vorgenommenen gleichartigen Experiment wurde der Wert pH = 7.2 gefunden, was der Salzwirkung zuzuschreiben ist.

IV. ÜBER DAS FERMENT AUS WEIZENMALZ.

Darstellung von Ferment aus Weizenmalz.

Weizenmalz wurde im Mörser mittelst Mörserkeule zermalmt und etwa 5faches Wasser hinzugefügt. Die Flüssigkeit wurde von Zeit zu Zeit gerührt und nachdem sie bei Zimmertemperatur eine Stunde digeriert worden war, durch eine Schicht von Papierbrei vollständig klar filtriert. Unter allmählicher Hinzufügung von etwa 7–8 fachem absolutem Alkohol zum klaren Auszug wurde die Flüssigkeit umgerührt. Der abgeschiedene Niederschlag wurde filtriert, im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und als Pulver aufbewahrt.

Wenn man das auf diese Weise dargestellte Ferment-Pulver mit Wasser schüttelt, erhält man getrübte Lösung, welche nach wiederholter Filtration eine klare Fermentlösung gibt. Lässt man in dieser Lösung das Gliadin schwimmen, so kann man makroskopisch betrachten, dass sich eine an die Rivaltasche Reaktion erinnernde zu Boden sinkende weissliche Wolke bildet und dass das Gliadin verdaut wird.

Experiment 5.

In nachfolgenden Experimenten wurde die Wirkungsweise des aus Weizenmalz hergestellten proteolytischen Fermentes und Pepsins auf Gliadin verglichen, indem aus seinen Zersetzungsprodukten der Gesamtstickstoff nach der Folin-Farmerschen mikrochemischen Methode und der Aminostickstoff nach der van Slykeschen Methode (1912–13) bestimmt wurden. Zum Nachweis des freien Ammoniaks bediente ich mich der Nessler-Winklerschen Lösung.

a) Experiment mittelst des aus Weizenmalz hergestellten Ferments.

Das Gliadin wurde im Verhältnis von 1 Prozent zu der 0.1%igen klar filtrierten Fermentlösung hinzugefügt, eine Nacht (14 Stunden) stehen gelassen und klar filtriert.

Alsdann wurde die Bestimmung des Gesamt- und Aminostickstoffs dieses Filtrats ausgeführt und folgendes Resultat erhalten.

Gesamtstickstoff in 2 ccm Fermentlösung: 0.140 mg.
Gesamtstickstoff in 2 ccm Filtrat des Verdauungsgemisches: 0.658 mg.

Also ist die Menge des aus Gliadin stammenden, in 2 ccm Fermentlösung sich auflösenden Gesamtstickstoffes 0.518 mg.

Aminostickstoff in 2 ccm Fermentlösung: 0.036 mg.
Aminostickstoff in 2 ccm Filtrat des Verdauungsgemisches: 0.071 mg.

Und die Menge des Aminostickstoffes der in N/320 HCl gesättigten Gliadinlösung war unbestimmbar klein und durch die van Slykesche Methode bestimmbarer Aminostickstoff war nicht enthalten. Der infolge der Wirkung des Ferments entstandene Aminostickstoff beträgt demgemäss in 2 ccm Ferment-Gliadin-Lösung 0.035 mg, sodass der Prozentsatz zum Gesamtstickstoff des Aminostickstoffs sich auf etwa 6.8% beläuft. Auch bei Verwendung der Nessler-Winklerschen Lösung kann in der Ferment-Gliadin-Lösung freies Ammoniak nicht nachgewiesen werden.

b) Experiment mittelst des Pepsins.

Zwei Teile von im Handel als " rein " bezeichnetem Pepsin wurden in tausend Teilen 0.2%iger Salzsäurelösung gelöst und das Gemisch wiederholt klar filtriert. Das Gliadin wurde nun zu dieser Pepsin-Salzsäurelösung im Verhältnis von 1.5 Prozent gelöst, und das Gemisch unter Toluolzusatz während 13 Stunden im Brutschrank bei 37°C gehalten. Dann bestimmte ich, wie oben erwähnt, den Gesamt- und Aminostickstoff dieses Filtrates und der Fermentlösung, und kam zum folgenden Resultate.

Gesamtstickstoff in 2 ccm Pepsin-Salzsäurelösung: 0.168 mg.
Gesamtstickstoff in 2 ccm Filtrat des Verdauungsgemisches: 4.158 mg.

Somit ist die Menge des aus dem Gliadin stammenden, in 2 ccm Pepsin-Salzsäurelösung sich lösenden Gesamtstickstoffes 3.99 mg.

Aminostickstoff in 2 ccm Pepsin-Salzsäurelösung: 0.081 mg.
Aminostickstoff in 2 ccm Filtrat des Verdauungsgemisches: 0.226 mg.

Da, wie bereits mitgeteilt, das Gliadin selbst keinen nach dem van Slykeschen Verfahren bestimmbaren Aminostickstoff enthält, zeigt die Differenz zwischen den zwei oben angegebenen Werten die Menge des durch die Wirkung des Pepsins aus Gliadin freigemachten Aminostickstoffs. Der Prozentsatz dieses Aminostickstoffs zum Gesamtstickstoff ist daher circa 3.6%.

Das freie Ammoniak lässt sich nicht in der durch Pepsin-Salzsäurelösung behandelten Gliadinlösung eben bei Verwendung der Nessler-Winklerschen Lösung nachweisen.

In Erwägung vorstehender Resultate gelange ich zum Schluss, dass die Wirkungsweise beider Fermente auf Gliadin ausserordentlich ähnlich ist, sodass kein erheblicher Unterschied zwischen ihnen gefunden werden kann und nur eine geringe Verschiedenheit der Intensität ihrer Wirkung existiert.

V. PARTIELLE HYDROLYSE.

Experiment 6.

Die Salzsäurelösung, die ich bei der partiellen Hydrolyse verwandte, hatte ich auf folgende Weise hergestellt:

In den Messkolben von 250 ccm Inhalt wurden 40 ccm 5%iger Salzsäurelösung und 200 ccm 80%iger Alkohol abpipettiert und das Gemisch mit destilliertem Wasser bis zur Marke gefüllt. Die Lösung enthält daher 0.8% Salzsäure und 64% Alkohol.

Verfahren: 1.2 g Gliadin (d. h. 0.2016 g Gliadinstickstoff) wurde mit 30 ccm vorstehender alkoholischer Salzsäurelösung im Erlenmeyerschen Kolben eine Zeitlang am Rückflusskühler im Wasserbad bei 70°C erwärmt. Das Gemisch wurde nun in den Messkolben von 100 ccm Inhalt hineingebracht und nach Hinzufügung von 50 ccm 10%iger Trichloressigsäure mit destilliertem Wasser bis zur Marke gefüllt. Die Lösung wurde eine Stunde später klar filtriert und

1. der Gesamtstickstoff nach der Folin-Farmerschen mikrochemischen Methode,

2. das freie Ammoniak nach der Folinschen Methode (1920) und
3. der Aminostickstoff unter Befreiung des Ammoniaks nach der van Slykeschen Methode bestimmt.

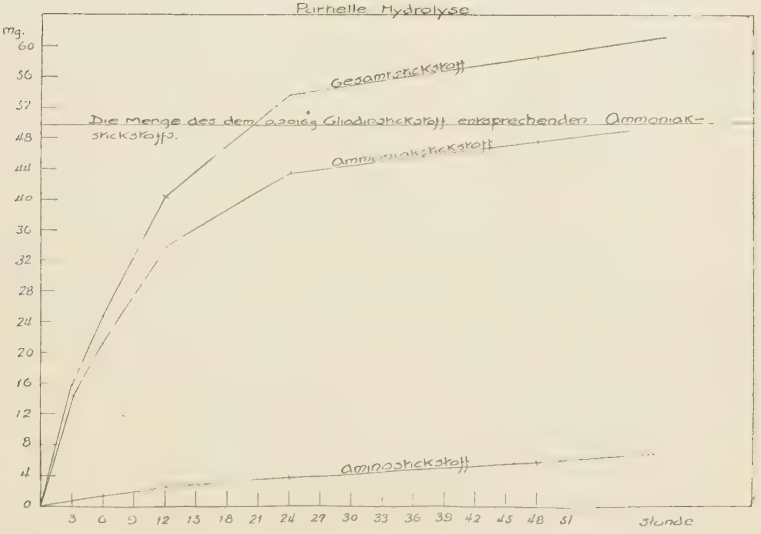
Die Verteilung des durch Trichloressigsäure nicht fällbaren Stickstoffs von 0.2016 g Gliadinstickstoff wird auf Grund vorstehender Ergebnisse nachstehend tabellarisch zusammengestellt.

TABELLE V.

Verteilung des durch Trichloressigsäure nicht fällbaren Stickstoffs.

Stunde	Gesamtstickstoff	Ammmoniakstickstoff	Aminostickstoff
	mg	mg	mg
3	15.87	14.50	0.75
6	24.73	21.47	1.51
12	40.13	33.83	2.64
24	53.27	43.40	3.64
48	58.33	47.37	5.76

Fig. 3.



Um die Verhältnisse des Gesamt-, Ammoniak- und Aminostickstoffes in Tabelle V zu einander leicht verständlich zu machen, werden sie vorstehend in Figur 3 gezeigt.

Geschwindigkeit und Grad der Säureamidspaltung wurden durch die Umrechnung aus abgespaltetem Ammoniak verfolgt. In folgender Tabelle ist das zersetzte Ammoniak in Prozent nach verschiedenen Stunden der Hydrolyse angegeben.

TABELLE VI.

Grad der Ammoniakspaltung.

Stunde	Prozent des abgespalteten Ammoniaks zu abspaltbarem Ammoniak *
3	29.2
6	43.3
12	68.2
24	87.5
48	95.5

* Nach der Angabe von Th. B. Osborne, Donald D. van Slyke, C. S. Leavenworth und M. Vinograd (1915) wurde der Ammoniakstickstoff des Gliadins als 24.61% berechnet.

Experiment 7.

Nachdem ich 2.4 g Gliadin (d. h. 0.4032 g Gliadinstickstoff) 48 Stunden schwach hydrolysiert hatte, behandelte ich es durch Trichloressigsäure und filtrierte. Unter Hinzufügung von 10 ccm Phosphorwolframsäurelösung zu 90 ccm dieses Filtrates wurde die Diaminosäure vollständig entfernt und das neue Filtrat mit Zusatz von Natriumkarbonat alkalisch gemacht und durch Durchleiten von Luftstrom vom Ammoniak befreit. Der Gehalt an Gesamt- und Aminostickstoff in dieser Lösung wurde bestimmt.

Gesamtstickstoff, stammend aus 0.2016 g Gliadinstickstoff:	9.02 mg.
Aminostickstoff, stammend aus 0.2016 g Gliadinstickstoff:	4.16 mg.

Darauf wurde eine bestimmte Menge desselben Filtrats in den Erlenmeyerschen Kolben unter Hinzufügung von etwa doppelter Menge konzentrierter Salzsäure (spez. Gewicht 1.19) 10 Stunden lang am Rückflusskühler im Wasserbad der vollständigen Hydrolysierung unterworfen. Nach Beseitigung des Rückflusskühlers dämpfte ich den grossen Teil der Salzsäure und kühlte ab, indem ich mit destilliertem Wasser zur ursprünglichen Filtratsmenge auffüllte. Nach Filtration bestimmte ich auf dieselbe Weise wie oben den Gesamt- und Aminostickstoff.

Gesamtstickstoff, stammend aus 0.2016 g Gliadinstickstoff:	8.89 mg
Aminostickstoff, stammend aus 0.2016 g Gliadinstickstoff:	4.35 mg

Gemäss den vorerwähnten Ergebnissen (Experiment 6 u. 7) konnte ich feststellen, dass, wie auch von H. B. Wickery (1922) angegeben wurde, das Gliadin durch schwache Säurehydrolyse leicht von Ammoniak befreit wird und dass gleichzeitig ein kleiner Teil davon zu Aminosäure abgespaltet wird. Th. B. Osborne und O. L. Nolan (1920) äusserten sich dahingehend, dass, wenn das Gliadin mit 1%iger Salzsäurelösung 2 Stunden lang gekocht werde, etwa dieselbe Menge Ammoniak gewonnen werde, wie man es durch 24stündiges Kochen mit 20%iger Salzsäurelösung erhalte.

Durch die Berechnung aus der in den Experimenten 6 und 7 erhaltenen Zahl lässt sich die Verteilung des Ammoniak-, Diamino-, Monoamino- und Nonaminostickstoffs etwa wie in folgender Tabelle angeben.

TABELLE VII.

Stickstoffverteilung, aus 0.2 g Gliadinstickstoff stammend.

	g
Ammoniakstickstoff	0.047
Diaminostickstoff	0.002
Monoaminostickstoff	0.004
Nonaminostickstoff	0.005
Summe	0.058

Die obige Summe von 58 mg stimmt mit der an anderer Stelle in Tabelle V aufgeführten Zahl von 58 mg Gesamtstickstoff genau überein.

Th. B. Osborne, Donald D. van Slyke und ihre Mitarbeiter (1915) bestimmten nach dem Verfahren van Slykes die Verteilung des Gliadinstickstoffes und veröffentlichten folgende Tabelle :

Gliadin	Van Slyke Method
	Percent of total nitrogen (Average of corrected results)
Ammonia-N	24.61
Humin-N	0.58
Cystine-N	0.80
Arginine-N	5.45
Histidine-N	3.39
Lysine-N	1.33
Amino-N of filtrate	51.95
Nonamino-N of filtrate	10.70
Total	98.81

Auf Grund nach der vorstehenden Tabelle würden aus 0.2 g Gliadinstickstoffe stammen :

Ammoniakstickstoff	0.05 g
Diaminostickstoff	0.02 g
Monoaminostickstoff	0.10 g
Nonaminostickstoff	0.02 g

Wenn man daher die obenstehende Tabelle mit Tabelle VII vergleicht, so wird man sehen, dass der grösste Teil des Ammoniakstickstoffes befreit wird und zugleich auch

25% von Nonaminostickstoff (d. h. Prolin),

10% von Diaminostickstoff und
4% von Monoaminostickstoff

gespaltet werden.

VI. Vergleich der Eigenschaften des Gliadins mit denen des Produktes der partiellen Hydrolyse desselben.

Experiment 8.

Wenn das Gliadin nach dem vorstehenden Verfahren 48 Stunden hydrolysiert und dieses Hydrolyseprodukt durch Hinzufügung von schwacher Natronlaugelösung bis zur schwach sauren Reaktion mit Hilfe des Lackmus neutralisiert wird, so bildet sich ein Niederschlag. Dieser wird dann nach Filtrierung mittelst gehärteten Filterpapiers und des Buchnerschen Filters mit destilliertem Wasser und Äther ausgewaschen und unter möglichster Beseitigung von Wasser im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und pulverisiert.

Das auf diese Weise hergestellte Pulver hat eine schwach gelblichweisse Färbung und Stickstoffgehalt von 12.6%.

Zur Betrachtung der Veränderung der Löslichkeit des Gliadins nach der partiellen Hydrolyse wurde das Hydrolyseprodukt einerseits zu einer gewissen Menge Alkohol bei 30°C im Überschuss zugefügt und sein Löslichkeitsgrad nach dem im Experiment 1 a erwähnten Verfahren bestimmt, während es andererseits mit N/320 HCl od. N/40 NaOH bei Zimmertemperatur (ca. 23°C.) 3 Stunden lang geschüttelt und filtriert wurde. Zugleich wurde die Löslichkeit des Gliadins in N/320 HCl und N/40 NaOH bei gegebener Bedingung ermittelt. Die Resultate des Experiments werden in folgender Tabelle angegeben.

TABELLE VIII.

Löslichkeitsgrad des durch unvollständige Hydrolyse dargestellten Pulvers und des Gliadins.

Lösungsmittel	Prozent des durch unvollständige Hydrolyse dargestellten Pulvers	Prozent des Gliadins	Temperatur
70% Alkohol	0.18	unendlich	30°C.
N/320 HCl	0.22	0.72	Bei Zimmertemperatur (ca. 23°C.)
N/40 NaOH	2.78	1.04	

Wie aus der vorstehenden Tabelle bekannt, setzt sich der Löslichkeitsgrad des Pulvers in 70% Alkohol bedeutend herab, was auch bei N/320 HCl der Fall ist, bei N/40 NaOH jedoch erhöht sich der Löslichkeitsgrad beträchtlich.

Experiment 9.

Ferner wurde eine Vergleichung in Präzipitationsreaktion zwischen dem Gliadin und dem Hydrolyseprodukte gemacht. Ich stellte nämlich von jedem Pulver eine 1%ige Lösung mit N/100 NaOH her und nahm bei Kaninchen alle drei Tage intravenöse Injektion mit je 1 ccm Lösung im gangzen 5mal vor. Am 5. Tage nach der letzten Injektion wurde von einem Ohrläppchen das Blut entnommen. Mittelst des gewonnenen Immunserums wurde, wie die nachstehende Tabelle zeigt, eine Präzipitationsreaktion nach der Ringprobe (Ascoli, Fornet) angestellt. Als positiv wurde diejenige Probe angesehen, bei der ein weisslicher Ring an der Berührungsfläche beider Flüssigkeiten bei Zimmertemperatur innerhalb 30 Minuten sichtbar wurde.

TABELLE IX.

Präzipitationsreaktion mittelst der Ringprobe.

Verdünnungsgrad der 1%igen Gliadinlösung	Gliadin-Immunserum I	Gliadin-Immunserum II	Hydrolyseprodukt-Immunserum I	Hydrolyseprodukt-Immunserum II
Kontrolle	—	—	—	—
1:20	+	+	+	+
1:40	+	+	+	+
1:80	+	+	+	±
1:160	+	+	±	—
1:320	+	+	—	—
1:640	+	+	—	—
1:1280	+	+	—	—
1:2560	+	+	—	—
1:5120	+	±	—	—
1:10240	+	—	—	—
1:20480	+	—	—	—
1:40960	+	—	—	—
1:81920	±	—	—	—
1:163840	—	—	—	—

Von Immunserum 0.2 ccm, Gliadinlösung (in N/200 NaOH gelöst) 0.4 ccm angewandt.

Kontrolle = N/200 NaOH (0.4 ccm).

TABELLE X.

Präzipitationsreaktion mittelst der Ringprobe.

Verdünnungsgrad der 1%igen Hydrolyseproduktlösung	Gliadin-Immunserum I	Gliadin-Immunserum II	Hydrolyseprodukt-Immunserum I	Hydrolyseprodukt-Immunserum II
Kontrolle	—	—	—	—
1:20	+	—	—	±
1:40	+	—	—	—

Verdünnungsgrad der 1%igen Hydrolyseprodukt-lösung	Gliadin-Immunserum I	Gliadin-Immunserum II	Hydrolyse-produkt-Immunserum I	Hydrolyse-produkt-Immunserum II
1:80	+	—	—	—
1:160	±	—	—	—
1:320	—	—	—	—
1:640	—	—	—	—
1:1280	—	—	—	—
1:2560	—	—	—	—
1:5120	—	—	—	—
1:10240	—	—	—	—
1:20480	—	—	—	—
1:40960	—	—	—	—
1:81920	—	—	—	—
1:163840	—	—	—	—

Von Immunserum 0.2 ccm, Hydrolyseprodukt-lösung (in N/200 NaOH gelöst) 0.4 ccm angewandt.

Kontrolle=N/200 NaOH (0.4 ccm).

In Erwägung der vorstehenden beiden Tabellen scheint das durch vollständige Hydrolyse hergestellte Pulver die Wirkung als Antigen verloren zu haben; es bildet kein Präzipitin und enthält eine kleine Menge unveränderten Gliadins, sodass es auf das Gliadin-Immunserum mit hohem Titel und das damit erhaltene Immunserum auf die verhältnismässig starke Gliadinlösung eine leichte Gegenwirkung hervorgerufen zu haben scheint.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Das Gliadin ist bei 30°C in Alkohol von 60–70 Volumprozent am besten löslich und dessen Löslichkeit ist unendlich.

2. Bei Zimmertemperatur (10–11°C) löst sich das Gliadin am besten in N/320 HCl und N/40 HaOH. In höherer wie auch in minderer Konzentration vermindert sich die Löslichkeit ziemlich beträchtlich.

3. Der isoelektrische Punkt des Gliadins liegt etwa bei pH=6.6.

4. Die Wirkungsweise des aus Weizenmalz dargestellten Ferments auf Gliadin ähnelt ausserordentlich sehr derjenigen des Pepsins. Wenn nämlich auch die Vermehrung des Stickstoffs nach van Slyke dabei gefunden wird, so wird doch das Freiwerden des Ammoniaks nie beobachtet.

5. Erwärmt man das Gliadin in 0.8%iger Salzsäurelösung in verdünntem Alkohol (64%) bei 70°C, so spaltet es mit der Zeit eine grosse Menge Ammoniak ab und gleichzeitig wird eine kleine Vermehrung des nach dem van Slykeschen Verfahren bestimmbaren Aminostickstoffes beobachtet. Mit der Befreiung des grössten Teils des Ammoniakstickstoffes durch 48-stündige Säurehydrolyse werden zu gleicher Zeit etwa 25% des Nonaminostickstoffes (d. h. Prolin), etwa 10% des Diaminostickstoffes und etwa 4% des Monoaminostickstoffes abgespaltet.

6. Der Löslichkeitsgrad des durch 48-stündige Säurehydrolyse zubereiteten Pulvers im 70% Alkohol setzt sich erheblich herab, der in N/320 HCl ebenfalls ziemlich stark herab, während er bei N/40 NaOH in die Höhe geht.

7. Dieses Pulver bildet, verschieden von Gliadin, keine Präzipitine, es besitzt wegen der in demselben enthaltenen geringen Menge des unveränderten Gliadins eine schwache Präzipitationsreaktion auf Gliadin-Immunserum mit hohem Titel. Im Gegenteil wird bei dem Immunserum des Pulvers eine schwache Reaktion bei relativ starker Gliadinlösung wahrgenommen.

Bei dieser Gelegenheit erlaubt sich der Verfasser der vorliegenden Abhandlung Herrn Prof. S. Kakiuchi für die ausserordentlich freundliche Leitung seinen besten Dank zum Ausdruck zu bringen.

LITERATUR.

Folin, O. (1920): Laborat. Manual of Biolog. Chemistry, 91.
Folin, O. & Farmer, C. J. (1912): Journ. biol. chem., **11**, 492.
Henriques, V. u. Gjaldbaek, J. K. (1911): Zeits. f. physiol. Chem., **75**, 362.
Kraus, R.: Kolle u. Wassermann, Handbuch d. pathogenen Mikroorganismen, II. Band, I. 756.
Osborne, Th. B. & Vorhees, C. G. (1893): Amer. chem. Journ., **15**, 392.
Osborne, Th. B. & Harries, I. F. (1906): Amer. J. of physiol., **17**, 223.
Osborne, Th. B., van Slyke, D. D., Leavenworth, C. S. & Vinograd, M. (1915): Journ. biol. chem., **22**, 259.
Osborne, Th. B. u. Strauss, E: Abderhaldens Handbuch d. bioch. Arbeitsmeth., Abt. I. Teil 8, Seite 437.
Osborne, Th. B. & Nolan, O. L. (1920): Journ. biol. chem., **18**, 311.
Vickery, H. B. (1922): Journ. biol. chem., **53**, 495.
van Slyke, D. D. (1911–12): Journ. biol. chem., **10**, 15.
van Slyke, D. D. (1912): Journ. biol. chem., **12**, 275.
van Slyke, D. D. (1913): Journ. biol. chem., **16**, 121 u. 125.

STUDIES ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF PHOSPHOLIPIN.

II. The Effect of the Presence of Albumin on the physico-chemical Properties of Lecithin.

By

NOBUZO FUJII.

(*From the Biochemical Laboratory of the Tokyo Imperial University.
Director: Prof. S. Kakiuchi.*)

(Recieved for publication, August 16, 1923).

INTRODUCTION.

It is quite obvious that lecithin and albumin, both constituting the cytoplasma, exert their influence mutually. To get some insight to this relation, I have studied first the effect of the presence of albumin on the solubility of lecithin, the results of which are reported in this paper.

About thirty years ago L. Liebermann (1893) prepared a compound from the tissue like lung, liver and kidney, which contained both lecithin and protein and which he called lecith-albumin. The validity of this compound was doubted by I. Bang (1911), who believed, however, in the existence of a compound of lecithin with globulin. Handovsky and Wagner (1911) studied the change of the viscosity of the mixture of lecithin and dialysed serum on the addition of sodium hydroxide and came to the conclusion that there was no compound existing between lecithin and dialysed serum. Feinschmidt (1912) observed that the precipitation of lecithin occurred on the addition of dialysed serum at the acidity where no floculation existed in the absence of serum. He concluded from the results of his study that the formation of a new complex of serum and lecithin is quite probable.

If we look back to the results of previous authors, the existence of a definite compound between albumin and lecithin seems quite doubtful, although there some complex precipitate may appear under certain conditions.

I have tried to solve this relation from another view point, i. e. from the change in transferability of lecithin from a watery solution into ether. When a quantity of watery solution of lecithin is shaken with an equal volume of ether, almost all of the lecithin remains in the watery layer, while the ether contains only an immeasurable amount of it. If, however, we put some of albumin solution into the mixture, lecithin becomes transferable into ether, the amount increasing with that of added albumin. I have therefore followed up the question of how the change occurs and the reason why.

MATERIAL.

Lecithin. Lecithin was prepared from egg-yolk by the method of Mac Lean (1918). The ratio of nitrogen and phosphorus in the substance was almost 1 : 1.

Albumin. The albumin was prepared in a pure state by repeated crystallization from egg-white, dialysed in a collodion bag from 3 weeks to 2 months, and freed from electrolyte as completely as possible by the electroendosmotic method. The concentration of such an albumin solution was found to be 1.3–2.1%.

Ether. Ether used in the following experiments was entirely freed from acidic impurities and saturated with water.

Glyceric acid. For the preparation of a buffer solution with definite acidity in our case an acid must be used which is insoluble in ether. Acetic acid, lactic acid, hydrochloric acid and others are all soluble in ether. The only acid, which answers our purpose, is glyceric acid. It is a fairly strong acid and sparingly soluble in ether.

PREPARATION OF GLYCERIC ACID.

The methods recommended by Mulder (1876), Bornstein (1885), Cazeneuve (1896), and Nef (1904) are the same in principle, basing on the oxidation of glycerole with nitric acid or with HgO or AgCl in alkaline medium.

On trying all these methods the author has found that it is quite difficult to obtain the free acid by these methods. My comparative study has also shown, that the first one is superior to the others in many respects. It has, however, two great faults as follows;

1) Inconstancy in the degree of oxidation of glycerole under the influence of hardly controllable circumstances.

2) The relatively large expenditure of time for the extraction of lead salts.

I have, therefore, modified Mulder's method in the purification or isolation of the free acid. The methods consist of chiefly four parts.

1) Oxidation of glycerole. To the mixture of 50 gm. of glycerole and 50 gm. of water in a tall cylindrical vessel, 50 gm. of concentrated nitric acid are introduced very slowly into the bottom of the cylinder by means of a long tube. After the lapse of 3–4 days, the contents is transferred into an evaporating dish and evaporated until the weight becomes nearly 90 gm.

This procedure is repeated as often as required and each preparation is gathered together and stored in a bottle.

2 Purification of lead salt. The material obtained as above is diluted in a large beaker with 2/3 litre of water for 90 gm. of the material and neutralized with pulverized $PbCO_3$, the quantity of which being about 133 gm. also for 90 gm. of the material. After a while, it is warmed to and kept at the temperature of about 61°–65°C for 2–3 hours under occasional stirring. The upper clear layer is decanted into a clean beaker and the lead salt is allowed to crystallize slowly. The mother liquid is to be used repeatedly for the extraction of the salt with the addition of water, which has been evaporated off during the procedure. The salt which is obtained in this manner, should be entirely white. If not so, it is quite impossible to use it for our purpose.

If the oxidation of glycerole were incomplete, the liquid would not only become a brown colour in warming, but would also strongly reduce the alkaline solution of copper.

The above is Mulder's method.

The solution must be, also, free from any trace of nitric acid. The solution obtained as above, however, includes almost always a trace of it, as the evaporation remains incomplete.

But this trace of nitric acid could easily be entirely removed by means of tin-powder as suggested by Prof. Dr. S. Kakiuchi.

3) *Removal of lead from the salts.* The snow-white lead salt is dissolved now in warm water and treated with SH_2. so that the lead is precipitated totally as lead sulfide. The latter is then filtered off and the filtrate is evaporated.

The free glyceric acid thus obtained is a slightly coloured syrup and shows a strong acidic reaction. It becomes canary yellow on the addition of a very much diluted ferric chloride solution, this being the characteristic reaction for all oxyacids. It contains neither Cl' nor NO_3' and shows no reducing action for alkaline copper. It is however always difficult to free from SO_4''.

4) *Purification of glyceric acid.* To take off a trace of SO_4'', a small excess of $Ba(OH)_2$ solution is added to the substance and after evaporation the mixture is extracted with aceton. The residue, which is obtained by evaporation of aceton, will be pure glyceric acid.

A little portion of it, taken in a small beaker, was neutralized with calcium carbonate, and precipitated by alcohol. This precipitate is a white silky shining crystal. It melts at 134°–135°C.

It is quite clear that the acid, which has been obtained under all these procedures, is entirely pure.

GLYCERIC ACID BUFFER.

In the following experiments, where the transferability of lecithin from water to ether is studied at a certain constant acidity, it is a matter of great importance that the acid used for the preparation of the buffer mixture should be insoluble or sparingly soluble in ether. If the acid is fairly soluble in ether the concentration of acid in a watery solution decreases and the acidity of the solution tends to shift to the alkaline side. Almost all of the acid, used at present in a buffer mixture as acetic acid and lactic acid is fairly soluble in ether. Besides, for my purpose, a buffer stronger than those of acetic or lactic acid mixture is necessary. These two requirements are tolerably well met with glyceric acid, as it is quite a strong acid and its solubility in ether is very slight. The dissociation constant and partition quotient of acetic, lactic and glyceric acid can be seen in the following table.

TABLE I.

	Acetic acid	Lactic acid	Glyceric acid
Dissociation constant	$1.8/10^{-5}$	$1.38/10^{-4}$	$2.3/10^{-4}$
$\frac{\text{Solubility in } H_2O\text{-layer}}{\text{Solubility in ether-layer}}$	2-1* (18°C)	10–12** (15°–27°C)	118–121 (20°C)

I have therefore prepared a series of buffer solutions consisting of glyceric acid and its sodium salt. The values of pH obtained by calculation are tested both by electrometrical and indicator method. The ratio of mixing and value of acidity are given in the following table.

---

* de Kolossovsky (1911): Bull. soc. chimi (Paris) (4) **9**, 632.

** Pinnow, J. (1915): Zs. analy. Chemie, **54**, 321.

TABLE II.

No. of mixture	Nature of mixture						pH		
	$\frac{m}{40}$ Na-glycerinate	N-glyceric acid	$\frac{N}{10}$ " "	$\frac{N}{400}$ " "	$\frac{N}{4000}$ " "	H_2O	Calculated	Found	
								Electrometr.	Colorimetr.
	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.			
I	2.0	6.4	—	—	—	1.6	1.5	2.02	2.0
II	2.0	3.2	—	—	—	4.8	1.8	2.26	2.2
III	2.0	1.6	—	—	—	6.4	2.1	2.4	2.4
IV	2.0	0.8	—	—	—	7.2	2.4	2.65	2.7
V	2.0	—	4.0	—	—	4.0	2.7	2.88	2.9
VI	2.0	—	2.0	—	—	6.0	3.0	3.11	3.1
VII	2.0	—	1.0	—	—	7.0	3.3	3.32	3.3
VIII	2.0	—	0.5	—	—	7.5	3.6	3.67	3.6
IX	2.0	—	0.25	—	—	7.75	3.9	3.90	3.9
X	2.0	—	—	5.0	—	3.0	4.2	4.20	4.2
XI	2.0	—	—	2.5	—	5.5	4.5	4.51	4.5
XII	2.0	—	—	1.25	—	6.75	4.8	4.80	4.8
XIII	2.0	—	—	0.63	—	7.37	5.1		
XIV	2.0	—	—	—	3.15	4.9	5.4		
XV	2.0	—	—	—	1.57	6.43	5.7		
XVI	2.0	—	—	—	0.78	7.22	6.0		

As will be seen from the table the value of pH found coincides quite well with that calculated except in a stronger acidity.

EXPERIMENT I.

The transferability of lecithin into ether from its watery solution was tested as follows:

1) 10 cc. of ca. 2% lecithin solution ($P_2O_5=16.98$ mgm.) was taken into a separating funnel, added an equal volume of water, and on adding of 50 cc. of ether was shaken thoroughly for several minutes. 35 cc. of separated upper ether layer was taken into an oxidation flask, the ether evaporated and its phosphorus content was determined as phospho-ammonium molybdate. Though a trace of yellow precipitate settled down, its amount was immeasurable.

2) To 10 cc. of lecithin solution was added 10 cc. of albumin solution of varying concentration and the mixture was shaken with 50 cc. of ether. 35 cc. of ethereal solution was pippetted out, the ether was evaporated, and after ignition (as usual after Neumann's method), phosphorus was precipitated as phospho-ammonium molybdate. Total P_2O_5 in ether in this case was 3.26–5.15 mgm. It was found by this experiment that lecithin becomes more transferable when the concentration of albumin increases.

As it has become clear that lecithin is more easily transferable into ether in the presence of albumin, which is highly hydrated in the watery solution, it may be natural to suppose that in the pure watery solution, hydration prevents lecithin from transfering itself into ether, while any factors which would tend to deprive lecithin of hydration will make the latter more transferable into ether.

To test this from other relations the following several experiments were performed.

EXPERIMENT II. THE EFFECT OF SALT.

The majority of salts form hydrates in their waterly solutions.

Their presence therefore may accelerate the transferability of lecithin. This is verified by the following experiments.

To the mixture 1 cc. of water and 1 cc. of salt solution of varying nature contained in each of a group of test tubes, 1 cc. of lecithin solution was added, shaken well, corked with rubber stopper and after the lapse of 30 minutes or one hour was carefully shaken with 5 cc. of ether. After about 30 minutes the volume of the upper ether layer is noted and the amount of phosphorus in 1 cc. of ethereal solution is determined by the method of Bloor (1918). The value found multiplied by the volume of upper ether layer indicates the amount transferred into ether. The results of the experiments are shown in the following table.

TABLE III.

1 cc. lecithin solution contains 3.32 mgm. as H_3PO_4.

Salt added	O	$\frac{m}{7}$ NaCl	$\frac{m}{7}$ $CaCl_2$	$\frac{m}{7}$ Na_2SO_4
abs. Amount (mgm.)	trace	3.15	3.28	3.18
Percentage		95	100	96

From the table it is obvious that presence of the salts greatly favours the transferability.

EXPERIMENT III. THE EFFECT OF ACID AND ALKALI.

The same procedure as employed in the case of the test with salt was used here, the only difference being that acid or alkali was used instead of salt. The results were as follows.

TABLE IV.

Salt added	O	$\frac{n}{7}$ H_2SO_4	$\frac{n}{7}$ HCl	$\frac{n}{7}$ NaOH	$\frac{n}{7}$ NH_4OH
Abs amount	trace	3.18	3.06	—	—
Percentage		96	92		

1 cc. lecithin solution contains 3.32 mgm. as H_3PO_4

As the table indicates all acids accelerate the transferability of lecithin, whereas alkali has no such effect. This effect of acid may be ascribed either to the effect of its hydration or the change of acidity of the solution, or both.

EXPERIMENT IV. THE EFFECT OF ACIDITY.

The effect of acidity was followed by means of a buffer solution. The method remained the same as above mentioned. The result is shown in the following table.

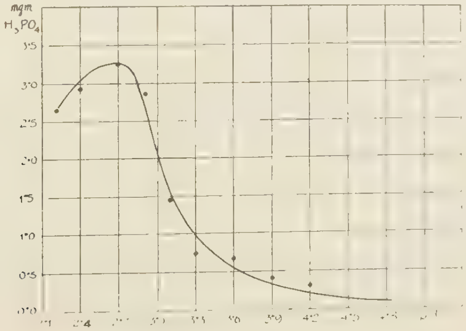
TABLE V.

pH	2.2	2.4	2.7	2.9	3.1	3.3	3.6	3.9	4.2	4.5	4.8	5.1	5.4
Abs. amount, mgm.	2.64	2.90	3.21	2.83	1.44	0.77	0.73	0.44	0.30	?	?	?	?
Percentage	76	83.5	92.5	81.5	41.5	22	21	12.7	8.7				
Degree of precipitation	+	++	+++	++	+	−	−	−	−	−	−	−	−

1 cc. lecithin solution contains 3.47 mgm. as H_3PO_4.

The degree of transferability seems to go hand in hand with the amount of precipitate. The isoelectric point of lecithin seems from this table to lie at about pH 2.7.

Fig. 1.



If we review all the above experiments it would seem to me quite natural to suppose that the transferability of lecithin from the watery solution to ether is mainly dependent on the degree of dehydration of lecithin. In alkaline reaction lecithin forms a highly dispersed system and hydration is clearly marked. In such a state lecithin remains almost entirely in watery solution. If, however, the solution is brought near to the isoelectric point of lecithin, by the addition of an adequate amount of acid, or the well ionizable salt is added, the lecithin begins to be dehydrated and in this condition it transfers itself easily into ether layer.

Experiment V. The Effect of Albumin.

As mentioned above any material, the presence of which causes dehydration of lecithin, favours its transferability into ether. If it is the truth, the addition of albumin to the lecithin solution ought to favour its tranferability into ether. This relation is clearly shown in my experiment as tabulated as followed.

TABLE VI.

Amount of albumin	0	0.13%	1.3%
Abs. amount, mgm.	trace	0.14	1.00
Percentage		4.3	30.

1 cc. lecithin contains 3.32 mgm. as H_3PO_4

Experiment VI. The Influence of the Presence of Salt and Albumin.

It will be quite interesting to test how the transferability of lecithin into ether is modified by the presence of salt and albumin, both of which are effective in rendering lecithin into more dehydrated state. The result is summarized in the following table.

TABLE VII.

Albumin	0	0.13%	1.3%
Aq.	%	% 4.3	% 30
$\frac{m}{7}$ NaCl	95	95	90
$\frac{m}{7}$ $CaCl_2$	100	90	89
$\frac{m}{7}$ Na_2SO_4	96	96.5	89
$\frac{n}{7}$ H_2SO_4	96	90	50
$\frac{n}{7}$ HCl	92	54	16.8

1 cc. lecithin solution contains 3.32 mgm. as H_3PO_4

As we can see from the above table in a pure watery solution albumin favours the increase of transferability, increasing with its concentrations, while in the presence of salts a larger amount of protein prohibits it to a certain extent. It seems to me highly probable that the salt combines with albumin, and that if the hydration degree of albumin salt compound is less than that of salt combining with albumin, the hydration of lecithin is promoted and lecithin becomes less transferable into ether. In the case of acid it combines with albumin and acidity decreases and with it transferability also diminishes.

Experiment VII. The Influence of Acidity in the Presence of Albumin.

In the last case we saw a large amount of albumin inhibits the favouring effect of acid in transferring lecithin into ether. Whether or not this is due only to the change of acidity, I proceeded to test the influence of the presence of albumin at varying acidity using a buffer to maintain the definite acidity. The concentrations of albumin were 2.1% and 0.01%. The results are shown in the following table and figure.

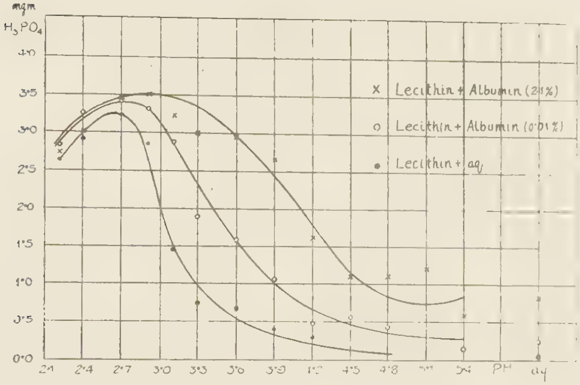
TABLE VIII.

1 cc. lecithin solution contains 3.47 mgm. as H_3PO_4.

pH	Lecithin + H_2O			Lecithin + albumin (0.01%)			Lecithin + albumin (2.1%)		
	1	2	Average	1	2	Average	1	2	Average
2.2	2.88	2.40	2.64	3.15	2.50	2.82	2.89	2.44	2.67
2.4	2.90		2.90	3.28	3.10	3.19	3.31	2.66	2.99
2.7	3.16	3.26	3.21	3.47	3.43	3.45	3.52	3.40	3.46
2.9	2.72	2.94	2.83	3.48	3.20	3.34	3.50		3.50
3.1	1.82	1.06	1.44	3.03	2.78	2.90	3.33	3.01	3.17
3.3	1.02	0.56	0.77	2.63	1.15	1.89	3.18	2.86	3.02
3.6	1.08	0.38	0.73	2.12	1.00	1.56	2.81	3.16	2.98
3.9	0.76	0.11	0.44	1.05		1.05	2.82	2.64	2.73
4.2	0.55	0.05	0.30	0.53	0.40	0.46	1.59		1.59
4.5				0.68	0.37	0.52	1.62	0.66	1.14
4.8				0.83	0.14	0.49	1.66	0.62	1.14
5.1				0.83			1.60	0.92	1.26
5.4				0.13		0.13	0.43	0.70	0.56
Aq.	trace	trace	trace	0.26	0.27	0.27	0.77	0.79	0.78

As it is clear from the table and figures the albumin favours the transferability of lecithin into ether and the range of acidity in which lecithin is easily transferred into ether, broadens in the alkaline side of the isoelectric point of lecithin. This is probably due to the larger dissociability of albumin at this region, with the increasing of hydration on the part of the albumin. Lecithin is accordingly more or less dehydrated and becomes easily transferable.

Fig. 2.



CONCLUSION.

1. The glyceric acid buffer is recommended for use in the test of partition quotient of any substance between ether and water at a certain constant acidity. The method of its preparation is described.

2. Lecithin does not altogether transfer itself from its watery solution into ether.

3. The addition of any substance which is liable of hydration promotes the transferability of lecithin from water into ether. Salt and albumin regarding this point are considered effective. The combined action is not additive and it more often retards the transferability than when used alone.

4. The latter fact is probably due to the formation of a compound between salt and albumin.

5. The isoelectric point of lecithin lies at pH=2.7.

6. The addition of albumin broadens the range of transferability of acidity far to the alkaline side of isoelectric point.

REFERENCES.

Bang, I., (1911): Chemie und Biochemie Lipoide.
Bloor, (1918): J. biol. Chem., **36**, 31.

Bornstein, E., (1885): B. d. d. chem. Ges., **18**, 3357.
Cazeneuve, (1896): Bull. de la soc. chim., (3) **15**, 763.
Feinschmidt, (1912): Biochem. Zs., **38**, 244.
Handovsky and Wagner, (1911): Biochem. Zs., **31**, 32.
Liebermann, L., (1893): Pflüger's Archiv, **54**, 574.
MacLean, (1918): Lecithin and allied substances.
Mulder, E., (1876): B. d. d. chem. Ges., **9**, 1902.
Nef, (1904): A. (Liebig), **335**, 317.
Neumann, (1902–4): Zs. physiol. Chem., **37**, 183.

ÜBER DEN NORMALEN WERT DER ZUCKERAUSSCHEIDUNGSSCHWELLE.

Von

MOTOTARO NAKAYAMA.

(*Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. Ryokichi Inada, Kaiserliche Universität zu Tokyo.*)

(Eingegangen am 19. Dezember 1923.)

Seit der Einführung der Mikrobestimmungsmethode des Blutzuckers in die Klinik ist die Diabetesfrage in vielen Punkten äusserst klar geworden. Hierher gehört auch die Frage der Zuckerausscheidungsschwelle. Obwohl die renale Glykosurie schon lange bekannt war, so hat man doch früher im allgemeinen geglaubt, dass sie nur selten vorkommt, so dass einige Autoren überhaupt die Existenz einer solchen Glykosurie negieren wollten. Heutzutage steht aber fest, dass die renale Glykosurie gar nicht selten getroffen wird und ausserdem der Schwellenwert der Diabetiker individuell ziemlich stark verschieden ist. Weil dieser Wert für die Diagnose und die Behandlung der Zuckerkrankheit von grosser Bedeutung ist, so wurde er in neuerer Zeit von vielen Seiten untersucht (Williams und Hamphreys 1919, Faber und Norgaard 1920, u. a.). Ich habe auch vor kurzem mit Sakaguchi und Matsuyama den Schwellenwert an 58 Diabetikern bestimmt und gefunden, dass er zumeist u. z. mit gleichmässiger Verteilung zwischen 0.12 und 0.20% lag, während Kranke mit einem Schwellenwerte von unter 0.11% oder über 0.21% selten waren. Für die klinische Praxis nicht minder bedeutungsvoll ist der Schwellenwert von Nichtdiabetikern. Obwohl es hierüber auch an Mitteilungen nicht fehlt (Jacobsen 1913, Hamman und Hirschmann 1917, Bailey 1919, Goto und Kuno 1920, Ono 1923, u. a.), so ist bei einigen davon das Untersuchungsmaterial zu klein und bei anderen die Bestimmungsweise des Schwellenwertes nicht einwandfrei. Man darf aber nicht ohne weiteres die Befunde am Diabetiker für den Gesunden heranziehen, weil von vielen Autoren (v. Noorden 1910, Liefmann und Stern 1906, Bailey 1919) behauptet wird, dass dieser Wert bei der Zuckerkrankheit im Laufe der Zeit allmählich ansteigt. Bei solcher Sachlage habe ich auf Veranlassung und unter der Leitung von Proff. R. Inada und K. Sakaguchi beabsichtigt, durch möglichst genaue Untersuchung an einer Anzahl von Gesunden wie Nichtdiabetikern, deren Krankheit mit der Höhe der Zuckerausscheidungsschwelle nichts zu tun haben scheint, den physiologischen Schwellenwert zu ermitteln.

Bei meiner Untersuchung habe ich für die Blutzuckerbestimmung die Bangsche Mikromethode und für die Bestimmung des Harnzuckers die Pavy-Kumagawa-Sutosche Methode gebraucht. Was die Bestimmung des Schwellenwertes anbetrifft, so habe ich vor kurzem mit Sakaguchi und Matsuyama ein genaues Verfahren mitgeteilt, welches auch bei dieser Arbeit angewandt wurde. Über dieses sei hier kurz mitgeteilt, indem die Punkte, welche nur für Zuckerkranke aber nicht für Nichtdiabetiker passen, ausgeschlossen werden. Zur Bestimmung des Schwellenwertes verfährt man so, dass man den Versuchspersonen einmal eine solche Kost resp. Zuckermenge verabreicht, welche eine ganz leichte Glykosurie nach sich zieht, und ein anderes Mal eine solche, welche ihrer Toleranzgrenze für Kohlenhydrat möglichst nahe liegt und doch keine Zuckerausscheidung verursacht. Die Veränderung des Blutzuckerwertes wird in beiden Versuchen halbstündlich 2–3 Stunden lang untersucht. Aus diesen Befunden schliessen wir, dass der Schwellenwert zwischen den maximalen Blutzuckerwerten in beiden Versuchen liegt. Wenn der Zucker zufällig nur in Spuren ausgeschieden wird, so nehmen wir an, dass der maximale Blutzuckergehalt in der betreffenden alimentären Hyperglykämie den Schwellenwert zeigt. Weil der maximale Zuckergehalt, den das Blut vor dem Auftritt der Glykosurie aufweist, stets höher liegt als der Schwellenwert, so kann man oft diese Tatsache zur Bestimmung der Schwelle heranziehen, indem man die letztere niedriger schätzt als den dabei gefundenen maximalen Blutzuckergehalt.

Wenn man zur Erzeugung der alimentären Glykosurie einfach eine dazu erforderliche grosse Menge Zucker als Lösung bei leerem Magen gibt, so wird sehr häufig über Übelkeit geklagt, auch Erbrechen kommt sogar nicht selten vor. Diese unangenehmen Erscheinungen zu umgehen habe ich den Versuchspersonen zuerst eine kohlenhydratreiche, nämlich unsere gewöhnliche Reiskost gegeben und bald danach eine passend gewählte Menge Traubenzucker in 200 ccm Wasser gelöst verabreicht. Weil es nicht immer gelingt, eine Hyperglykämie, welche der Zuckerausscheidungsschwelle ganz nahe liegt, künstlich zu erzeugen, so wurde die Untersuchung häufig mehrmals wiederholt. Aber in folgenden Tabellen sind nur die Untersuchungsresultate angegeben, welche zur Bestimmung des Schwellenwertes am besten verwendbar sind. Es gibt auch Fälle, wo bei wiederholten Untersuchungen stets eine Glykosurie auftrat und infolgedessen aus ihrer Stärke der Schwellenwert ungefähr geschätzt werden musste.

Um meine Untersuchungsresultate übersichtlich zu machen und sie mit den Schwellenwerten der Diabetiker in Vergleich zu stellen, wurde folgende Tabelle dargestellt, indem hier die zweite und dritte Kolonne aus der Tabelle I und die letzten beiden aus meiner früheren Mitteilung hergeleitet wurden, in welcher ich mit Sakaguchi und Matsuyama den Schwellenwert des Diabetikers nach demselben Verfahren wie in dieser Arbeit bestimmte.

TABELLE

Nr.	Name, Alter u. Geschlecht	Diagnose	Datum	Blutzucker-	
				Vor d. Essen	½ St. n. d. Essen
1	M. S. 17. ♀	Idiopathische Oesophagusdilatation	26/V 1921	0.083	**0.088**
			21/VI ,,	0.078	0.104
2	Z. A. 15. ♂	Chorea minor	3/III 1921	0.078	**0.101**
			5/III ,,	0.078	0.107
3	S. N. 28. ♀	Pleuritis sicca	16/III 1921	0.094	0.115
			18/III ,,	0.080	0.109
4	M. S. 24. ♂	tuberöse Sklerose	10/V 1921	0.072	**0.114**
			12/V 1921	0.078	**0.129**
5	M. K. 34. ♂	Ankylostomiasis	19/V 1921	0.085	**0.129**
			21/V ,,	0.084	**0.131**
			23/V ,,	0.102	0.100
			9/I 1922	0.105	**0.136**
6	N. U. 37. ♀	Arthritis	7/VI 1921	0.091	**0.133**
7	R. F. 36. ♂	Tabes dorsalis	15/IV 1921	0.084	**0.135**
8	S. N. 31. ♂	Kleinhirntumor ?	15/IV 1921	0.100	**0.138**
			8/III ,,	0.085	0.137
9	R. K. 59. ♂	Ankylostomiasis	9/III 1921	0.087	**0.138**
			12/IV ,,	0.085	**0.141**
10	Y. I. 49. ♂	Fettsucht	12/IX 1921	0.099	**0.143**
11	S. S. 45. ♂	Hemiplegia alternans	14/V 1921	0.077	0.110
			25/V ,,	0.082	0.135
12	T. I. 19. ♀	Infantilismus	19/VII 1921	0.107	**0.145**
13	S. K. 45. ♂	Neurasthenie	7/X 1921	0.098	0.115
14	H. O. 18. ♂	Gesund	16/VII 1922	0.096	**0.151**
			,,	0.082	**0.132**
15	S. M. 61. ♂	Gesund	17/X 1922	0.091	**0.143**
			19/X ,,		**0.135**
16	C. Y. 45. ♂	Tabes dorsalis	21/II 1922	0.078	0.128
			22/II ,,	0.081	0.130
17	A. N. 35. ♂	chronische Manganvergiftung	16/II 1921	0.076	0.114
18	Y. I. 31. ♂	Ischias	24/XI 1920	0.076	0.143
			1/XII ,,	0.087	0.121
19	E. W. 15. ♂	Gesund	27/VII 1922	0.096	**0.153**
			29/VII ,,	0.088	**0.143**
20	N. N. 41. ♀	Amöbendysenterie	17/IX 1922	0.082	**0.176**
			23/XII ,,	0.083	**0.138**
21	K. W. 32. ♂	Mitralfehler	5/III 1922	0.085	**0.160**
			8/III ,,	0.078	0.145
22	H. T. 26. ♀	Ankylostomiasis	5/II 1922	0.095	**0.162**
			7/II ,,	0.105	**0.148**
23	K. S. 27. ♂	Conuserkrankung	2/II 1922	0.108	**0.159**
			5/II ,,	0.098	**0.145**
24	S. I. 27. ♀	Gesund	25/II 1922	0.089	**0.156**
			25/II 1922	0.092	**0.163**
25	K. O. 25. ♀	Gesund	24/II 1922	0.104	**0.152**
			28/I ,,	0.094	**0.165**
26	H. M. 31. ♂	Gesund	28/I 1922	0.093	0.127

I.

gehalt (%)				Glykosurie			Schwellenwert (%)
1 St.	1½ St.	2 St.	3 St.	1 St. n. d. Essen	2 St.	3 St.	
0.083	0.078	0.078	0.082	spur	(—)	(—)	0.08
0.108	0.094	0.078		0.12	spur		
0.096	0.094	0.090		0.07	0.04		0.09
0.099	0.088	0.086		0.08	0.03		
0.120	0.110	0.105		(—)	spur		0.12
0.111	0.100	0.092		(—)	(—)		
0.096	0.103	0.097	0.099	(—)	(—)	(—)	0.13
0.102	0.100	0.097	0.085	spur	spur	(—)	
0.106	0.106	0.118	0.106	0.08	0.15	spur	0.13
0.100	0.097	0.093		(—)	(—)		
0.126	0.114	0.107	0.124	0.17	0.06		
0.108	0.123	0.118		spur	spur	(—)	
0.107	0.120	0.120	0.108	spur	spur	(—)	0.13
0.095	0.105	0.124	0.123	spur		(—)	0.13
0.110	0.126	0.126	0.110	0.09	spur	(—)	0.14
0.141	0.117	0.125		(—)	(—)	(—)	
0.123	0.122	0.110		(—)	(—)		0.14
0.125	0.125	0.124		0.07	(—)		
0.136	0.134	0.123	0.113	(—)	spur	(—)	0.14
0.144	0.109	0.122	0.115	(—)	(—)	spur	0.14
0.137	0.133	**0.140**	0.133	(—)	(—)	(—)	
0.137	0.122	0.128		spur	(—)		0.14
0.145	0.135	0.103	0.096	(—)	spur	(—)	0.14
0.130	0.121	0.116	0.115	0.11	0.07	(—)	0.14
0.125	0.124	0.103		(—)	(—)	(—)	
0.115	0.122	0.112		(—)	(—)		
0.128	0.096	0.091		0.08	0.13	0.17	0.14
0.151	**0.154**	0.133		spur	0.04	(—)	
0.145	0.138	0.120		spur	0.11		0.15
0.154	0.151	0.099		spur	(—)		0.15
0.164	**0.178**	0.149	0.106	0.42	(—)	(—)	0.15
0.140	0.108	0.132		(—)	(—)		
0.122	0.101	0.100		0.03	(—)		0.15
0.130	0.105	0.103		(—)	(—)		
0.152	0.151	0.153		0.05	0.08	spur	0.16
0.095	0.085	0.074		(—)	(—)		
0.126	0.119	0.117		spur	spur	(—)	0.16
0.155	0.145	0.103	0.100	(—)	(—)	(—)	
0.153	0.120	0.121	0.123	spur	(—)	(—)	0.16
0.138	0.109	0.107		(—)	(—)		
0.135	0.129	0.124			spur	(—)	0.16
0.138	0.120	0.121		(—)	(—)		
0.120	0.150	0.121		(—)	(—)		0.16
0.158	0.121	0.105		0.02	(—)		
0.125	0.093	0.121	0.114	(—)	(—)		0.16
0.151	0.141	0.108	0.100	0.04	(—)		
0.160	0.135	0.119	0.070	(—)	spur	(—)	0.16

Nr.	Name, Alter u. Geschlecht	Diagnose	Datum	Blutzucker-	
				Vor d. Essen	½ St. n. d. Essen
27	S. T. 30. ♂	Neurasthenie	25/II 1921	0.076	0.151
			29/II ,,	0.065	0.146
28	O. T. 31. ♂	Idiopathische	13/VII 1921	0.087	**0.166**
		Ösophagusdilatation	20/VII ,,	0.098	**0.172**
29	N. H. 42. ♂	Gesund	15/I 1922	0.092	0.142
30	S. K. 52. ♂	Magendilatation	2/X 1922	0.097	0.184
			4/X ,,	0.089	0.155
31	K. K. 52. ♂	Hemiplegie	3/X 1922	0.098	**0.174**
			8/X ,,	0.088	**0.145**
32	K. K. 18. ♂	Neurasthenie	21/VII 1922	0.093	**0.155**
			23/VII ,,	0.088	0.168
33	I. Y. 41. ♀	Gesund	25/X 1922	0.090	**0.159**
			27/X ,,	0.092	**0.200**
34	S. T. 25. ♂	Kakke	7/II 1922	0.098	0.172
			18/II ,,		0.145
35	D. T. 35. ♂	habituelle	6/III 1921	0.089	**0.173**
		Verstopfung	9/IV ,,	0.087	**0.176**
36	Y. S. 21. ♀	Pleuritis exsudativa	21/I 1922	0.077	**0.153**
			27/I ,,	0.107	**0.178**
37	T. H. 15. ♂	Sklerodermie	8/VII 1922	0.091	**0.164**
			10/VII ,,	0.088	0.154
38	N. I. 51. ♀	Magenptose	20/IX 1922	0.087	0.173
			21/IX ,,	0.092	0.163
39	K. U. 16. ♀	Neurasthenie	23/IX 1922	0.096	0.174
			25/IX ,,	0.089	0.168
40	K. T. 32. ♂	chronische	17/XI 1920	0.074	0.124
		Manganvergiftung	11/XII ,,	0.085	0.152
41	T. T. 29. ♂	Raynaudsche	28/V 1921	0.087	**0.187**
		Krankheit	18/V ,,	0.083	0.153
42	Y. T. 46. ♂	Lues spinalis	8/III 1921	0.102	**0.189**
			9/III ,,		**0.195**
43	I. I. 49. ♂	Lues spinalis	8/III 1921	0.086	0.157
44	T. A. 45. ♂	Tabes dorsalis	1/VI 1921	0.086	**0.186**
			29/V ,,	0.080	**0.190**
45	E. I. 25. ♀	Milztumor	14/II 1921	0.082	0.184
			9/III ,,	0.076	0.190
46	H. Y. 17. ♂	Spitzenkatarrh	27/IX 1922	0.098	0.169
			29/IX ,,	0.088	0.159
47	R. O. 60. ♂	Bronchitis	27/IX 1922	0.085	**0.203**
			29/IX ,,	0.093	**0.188**
48	K. Y. 61. ♂	Schrumpfniere	20/IX 1922	0.097	0.218
			9/X ,,	0.078	0.130
49	K. F. 23. ♂	Muskelatrophie	27/I 1921	0.093	0.162
50	Y. A. 18. ♂	Gesund	10/VII 1922	0.090	**0.189**
			13/VII ,,	0.085	**0.200**
51	T. N. 64. ♂	Schrumpfniere	21/X 1922	0.092	0.145
			18/XI ,,	0.089	0.138
52	T. U. 45. ♀	Mitralfehler	3/XI 1922	0.097	0.198
			6/XI ,,	0.090	0.185

gehalt (%)				Glykosurie			Schwellenwert (%)
1 St.	1½ St.	2 St.	3 St.	1 St. n. d. Essen	2 St.	3 St.	
0.152	0.122	0.104	0.100	(—)	(—)	(—)	0.16
0.156	**0.161**	0.156	0.105	0.18	(—)	(—)	
0.150	0.120	0.133		0.12	(—)		0.16
0.122	0.143	0.170		spur	(—)		
0.166	0.135	0.145	0.144	spur	(—)	(—)	0.16
0.201	0.117	0.114		0.09	0.08		0.17
0.162	0.141	0.100		(—)	(—)		
0.147	0.145	0.128		0.06	spur		0.17
0.136	0.125	0.102		(—)	(—)		
0.131	0.113	0.120		(—)	(—)		0.17
0.178	0.143	0.125		(—)	0.03		
0.137	0.123	0.128		(—)	(—)		0.17
0.168	0.135	0.116		0.2	(—)		
0.163	0.132	0.139		spur	(—)	(—)	0.17
0.152	0.151	0.125		(—)	(—)		
0.159	0.145	0.122		spur	(—)		0.17
0.173	0.117	0.101		0.44	(—)		
0.119	0.080	0.075		(—)	(—)		0.17
0.142	0.108	0.102	0.082	spur	0.03	(—)	
0.145	0.132	0.126	0.100	(—)	(—)	(—)	über 0.17
0.172	0.130	0.115		(—)	(—)		
0.185	0.143	0.110		(—)	spur	(—)	0.18
0.174	0.145	0.103		(—)	(—)		
0.137	0.113	0.110		(—)	(—)		0.18
0.190	0.156	0.121		0.09	(—)		
0.157	0.131	0.113	0.101	(—)	(—)	(—)	0.18
0.180	0.166	0.166	0.111	spur	(—)	(—)	
0.170	0.118	0.108	0.099	(—)	spur	(—)	0.18
0.183	0.105	0.105	0.098	0.09	(—)	(—)	
0.154	0.146	0.125	0.142	(—)	(—)	(—)	0.19
0.135	0.120	0.140		spur	(—)	(—)	
0.197	0.164	0.119	0.106	spur	spur	(—)	0.19
0.188	0.173	0.134		(—)	(—)	(—)	0.19
0.189	0.128	0.121	0.111	spur	0.02	(—)	
0.164	0.113	0.093		(—)	(—)		0.19
0.204	0.158	0.113		0.14	spur		
0.176	**0.202**	0.175		(—)	0.06		0.19
0.170	0.158	0.123		(—)	(—)		
0.203	0.150	0.138		0.06	(—)		0.20
0.175	0.156	0.121		(—)	(—)		
0.226	0.224	0.203		(—)	0.16		ca. 0.20
0.170	0.158	0.153		(—)	(—)		über 0.18
0.182	0.168	0.136	0.132	(—)	(—)	(—)	
0.180	0.155	0.110		(—)	(—)	(—)	über 0.20
0.177	0.144	0.128		(—)	(—)		
0.195	**0.200**	0.148		(—)	(—)		über 0.20
0.182	**0.196**	0.156		(—)	(—)		
0.215	0.179	0.164		(—)	(—)		über 0.215
0.198	0.170	0.123		(—)	(—)		

TABELLE II.

Schwellenwert (%)	Nichtdiabetiker		Diabetiker	
	Zahl der Fälle	Prozentsatz für gesamte Zahl	Zahl der Fälle	Prozentsatz für gesamte Zahl
0.08–0.09	2	3.9	0	0
0.12	1	1.9	5	8.6
0.13	4	7.7	7	12.1
0.14	8	15.4	5	8.6
0.15	4	7.7	6	10.4
0.16	10	19.2	4	7.0
0.17	7	13.4	9	15.5
über 5.17	1	1.9	0	0
0.18	4	7.7	6	10.4
über 0·18	1	1.9	0	0
0.19	5	9.6	8	13.8
0.20	2	3.9	5	8.6
über 0.20	3	5.8	0	0
0.21	0	0	0	0
0.22	0	0	2	3.4
über 0.23	0	0	1	1.7
Summe	52	100.0	58	100.0

Wie die Tabelle zeigt, ist der Schwellenwert auch beim Nichtdiabetiker individuell ziemlich stark verschieden. Bei meinen Untersuchungen an 52 Personen zeigte er eine Variationsbreite zwischen 0.08 und 0.21%. Aber in den meisten Fällen betrug er 0.13 bis 0.19% und der Wert unter 0.12% oder über 0.20% gehörte zu den Seltenheiten. Besonders häufig wurde der Wert zwischen 0.14 und 0.17% getroffen. Wenn man die Befunde am Zuckerkranken und am Nichtdiabetiker miteinander vergleicht, so ist kein auffallender Unterschied zwischen beiden ersichtlich. Aber man kann nicht ganz übersehen, dass niedrigere Schwellenwerte beim Nichtdiabetiker und höhere beim Zuckerkranken etwas häufiger beobachtet werden als bei anderen, was vermuten lässt, dass der Schwellenwert im grossen und ganzen bei Zuckerkranken etwas höher ist als beim Nichtdiabetiker.

Vor kurzem haben Sakaguchi, Matsuyama und Watanabe an 56 Gesunden den Grad der alimentären Hyperglykämie untersucht, welche bei ganz freiwilligem Leben in die Erscheinung tritt. Bei ihren Untersuchungen stieg der Blutzuckergehalt nach gewöhnlicher Kost sehr häufig, nämlich in 31 Fällen, über 0.14%. Der Auftritt der Glykosurie war aber ganz selten. Dieser Befund scheint auf den ersten Blick mit meinen Untersuchungsresultaten nicht in Übereinstimmung zu stehen. Wie Tabelle II zeigt, habe ich etwa in einem Drittel meiner Untersuchungspersonen den Schwellenwert niedriger als 0.14% gefunden. Wenn der Blutzuckergehalt nach gewöhnlicher Mahlzeit so häufig wie nach Angabe von Sakaguchi und seinen Mitarbeitern über 0.14% ansteigt, so liegt der Gedanke nahe, dass die alimentäre Glykosurie bei Gesunden auch bei gewöhnlichem Leben ziemlich häufig in die Erscheinung treten muss, was nach unserer täglichen Erfahrung wie nach dem Untersuchungsresultate von oben genannten Autoren nicht der Fall ist. Nun soll gefragt werden, woher diese Inkongruenz beider Arbeiten kommt. Bei Überlegung dieser Frage ist mir sofort eingefallen, dass sie sehr leicht lösbar ist, wenn die Zucker assimilierende Kraft mit der Höhe des Schwellenwertes in innigem Zusammenhang steht, so dass das Kohlenhydrat bei Personen mit niedriger Schwelle besser assimiliert wird und so alimentäre Hyperglykämie weniger ausgeprägt zustande kommt als bei Personen mit einer höheren.

Um zu sehen, ob ein gewisser Zusammenhang zwischen der Höhe des Schwellenwertes und der den Zucker assimilierenden

Kraft besteht, habe ich zuerst aus den oben auseinander gesetzten Versuchen, welche ich zur Ermittelung der Schwelle unter reichlicher Kohlenhydratverabreichung ausführte, die Untersuchungsresultate von Personen mit einem niedrigen Schwellenwerte ausgewählt und übersichtlich in einer Tabelle (Tabelle III) zusammengestellt. Es war auffallend, dass bei solchen Personen die alimentäre Hyperglykämie auch bei grosser Kohlenhydratzufuhr im allgemeinen nur unbedeutend ausfiel.

Zunächst habe ich zwei Reihen Versuchspersonen gewählt, deren Zuckerausscheidungsschwelle deutlich verschieden war, so dass sie in einer Reihe unter 0.15% und in einer anderen über 0.19% war. Um ihre Assimilationskraft für Kohlenhydrat miteinander zu vergleichen, habe ich ihnen Sakaguchis Probefrühstück, welches aus 100 g Reis (in lufttrockenem Zustande gewogen) oder aus 270 g gekochtem Reis und zwei Hühnereiern besteht, verabreicht und den Blutzucker halbstündlich 2-3 Stunden lang untersucht. Die einzelnen Daten sind in der Tabelle IV wiedergegeben.

Die Tabellen III und IV zeigen, dass die Assimilationsfähigkeit für Kohlenhydrat im allgemeinen bei Personen mit niedrigerem Schwellenwerte besser als bei denen mit einem höheren ist und so die alimentäre Hyperglykämie dort trotz grösserer Kohlenhydratzufuhr nur in geringerem Grade zustande kommt, während sie hier bei kleinerer Kohlenhydrataufnahme weit stärker in die Erscheinung tritt.

Aus dieser Tatsache lässt die Frage sich leicht erklären, warum nach Sakaguchi und seinen Mitarbeitern beim Gesunden bei gewöhnlichem Leben häufig eine ziemlich starke alimentäre Hyperglykämie, aber eine Glykosurie nur selten beobachtet wurde, während der Schwellenwert nach meiner Untersuchung bei vielen Leuten ziemlich niedrig liegt.

Bei Personen mit niedrigerem Schwellenwerte kommt die alimentäre Hyperglykämie wegen der kräftigen Assimilationsfähigkeit für Kohlenhydrat nur in geringerem Grade zustande und bei

TABELLE III.

Versuche bei Personen mit niedrigerem Schwellenwerte.

Nr.	Name u. Alter (Schwellenwert)	Datum 1922	Aufgenommenes Kohlenhydrat.		Blutzuckergehalt (%)						Maximaler Blutzuckerwert (%)
			gekocht. Reis (g)	Traubenzucker	Vor d. Essen	½ St. n. d. Essen	1 St.	1½ St.	2 St.	3 St.	
1	K. S. 28 (0.11)	10/IV	200	90	0.096	**0.123**	0.102	0.110	0.100	1.103	0.123
		11/IV	200	75	0.085	**0.139**	0.121	0.092	0.075		0.139
2	S. N. 31 (0.14)	15/I	450	100	0.100	0.138	0.110	0.126	0.126	0.110	0.138
3	M. S. 24 (0.12)	10/V	400	70	0.072	**0.114**	0.096	0.103	0.097	0.099	0.114
		12/V	400	80	0.078	**0.129**	0.102	0.100	0.097	0.085	0.129
4	R. F. 36 (0.13)	15/IV	450	85	0.084	**0.135**	0.095	0.105	0.124	0.123	0.135
5	M. K. 34 (0.14)	19/V	300	90	0.085	**0.129**	0.106	0.106	0.118	0.106	0.129
		21/V	300	70	0.084	**0.131**	0.100	0.097	0.093		0.131
		23/V	300	80	0.102	0.100	**0.126**	0.114	0.107	0.124	0.126
6	N. U. 37 (0.13)	7/VI	200	65	0.091	**0.133**	0.107	0.120	0.120	0.103	0.133
7	T. K. 59 (0.14)	9/III	450	110	0.087	**0.138**	0.123	0.122	0.110		0.138
		12/IV	450	120	0.085	**0.141**	0.125	0.125	0.124		0.141
8	S. S. 45 (0.14)	14/V	350	75	0.077	0.110	**0.144**	0.109	0.122	0.115	0.144
		25/V	300	65	0.082	0.135	**0.137**	0.133	0.140	0.133	0.137

TABELLE IV.

Versuche bei Personen mit höherem Schwellenwerte

Nr.	Name u. Alter	Schwellenwert	Datum 1922	Blutzuckergehalt (%)						Maximaler Blutzuckerwert (%)
				Vor d. Essen	½ St. n. d. Essen	1 St.	1½ St.	2 St.	3 St.	
1	K. M. 54	0.19	21/XI	0.083	0.175	**0.180**	0.157	0.144	0.118	0.180
			2/II	0.079	0.161	**0.171**	0.147	0.129	0.092	0.171
2	E. Y. 24	0.19	5/II	0.126	**0.151**	0.121	0.103	0.105	0.105	0.151
			27/I	0.108	**0.156**	0.130	0.098	0.089	0.084	0.156
3	T. T. 29	0.18	26/I	0.086	0.113	**0.123**	0.092	0.100	0.095	0.123
			8/II	0.095	**0.150**	0.130	0.108	0.102		0.150
4	Y. A. 18	über 0.20	20/VII	0.085	**0.156**	0.120	0.117	0.098		0.156
5	T. N. 64	über 0.20	18/XI	0.089	0.138	0.182	**0.196**	0.156		0.196
			20/IX	0.094	0.145	0.172	**0.174**	0.145		0.174
			27/XI	0.095	0.164	**0.171**	0.143	0.140		0.171
6	K. Y. 61	0.21	25/IX	0.095	0.133	0.142	0.145	**0.146**		0.146
			28/XI	0.098	0.141	**0.150**	0.143	0.125		0.150
7	R. O. 60	0.20	1/X	0.088	0.154	**0.166**	0.157	0.137		0.166
Versuche bei Personen mit niedrigerem Schwellenwerte.										
8	M. K. 24	0.13	13/II	0.083	**0.099**	0.097	0.097	0.092	0.093	0.099
			18/II	0.090	0.086	0.097	**0.100**	0.082		0.100
9	K. M. 27	0.15	21/V	0.096	**0.114**	0.099	0.091	0.095	0.090	0.114
			24/V	0.098	**0.111**	0.090	0.089	0.089		0.111
10	S. M. 61	0.14	23/X	0.080	**0.129**	0.129	0.103	0.097		0.129
11	T. I. 19	0.14	27/I	0.092	**0.118**	0.108	0.095	0.095	0.100	0.118
			29/I	0.088	**0.130**	0.101	0.095	0.102	0.105	0.130

Personen, bei denen eine starke Hyperglykämie häufig nach dem Essen vorkommt, liegt der Schwellenwert gerade höher, was zur Folge hat, dass alimentäre Glykosurie beim Nichtdiabetiker im allgemeinen nur selten getroffen wird.

Zunächst wollte ich die Beziehung des Schwellenwertes zu Geschlecht und Alter kennen lernen. Dazu wurden folgende Tabellen aus der Tabelle I abgeleitet.

TABELLE V.

Alter u. Geschlecht	10-20		21-30		31-40		41-50		51-60		über 60		Summe	
Schwellenwert (%)	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
unter 0.10	1	1											1	1
0.12				1									0	1
0.13			1		2	1							3	1
0.14	1	1			1		3		1		1		7	1
0.15	1				2		1						4	0
0.16			2	3	3		1	1					6	4
0.17	1		1	1	1			1	1	1			4	3
über 0.17	1												1	0
0.18		1	1		1					1			2	2
über 0.18			1										1	0
0.19	1			1			3						4	1
0.20									1		1		2	0
über 0.20	1							1			1		2	1
0.21														
Summe	7	3	6	6	10	1	8	3	3	2	3		37	15

Aus der Tabelle kann man keinen besonderen Zusammenhang zwischen der Schwelle und dem Geschlecht ersehen.

Weil in dieser Tabelle der Zusammenhang zwischen dem Schwellenwerte und dem Alter nicht ohne weiteres zurückgewiesen werden kann, so habe ich Tabelle VI und VII dargestellt, um die Sache noch leichter ersehen zu können.

TABELLE VI.

Alter	Zahl der Versuchspersonen mit dem Schwellenwerte von			
	unter 0.14%	0.15–0.17%	0.18–0.20%	über 0.20%
10–20	4	2	3	1
21–30	2	7	3	0
31–40	4	6	1	0
41–50	3	4	3	1
51–64	2	2	3	1
Summe	15	21	13	3

TABELLE VII.

Zuckerausscheidungsschwelle	Zahl der Untersuchungspersonen		
	unter 40 Lj.	über 41 Lj.	Summe
unter 0.17%	25 (75.8%)	8 (24.2%)	33 (100%)
über 0.18%	11 (57.9%)	8 (42.1%)	19 (100%)

Bei Leuten unter 40 Jahren ist die Schwelle zumeist unter 0.17%, während der höhere Schwellenwert bei älteren Leuten häufiger beobachtet wird. Daraus könnte man wohl vermuten, dass der Schwellenwert im allgemeinen bei älteren Leuten etwas höher liegt als bei jüngeren.

Als Anhang sei hier mitgeteilt, dass der Blutzuckergehalt im morgens nüchternen Zustande bei meinen 202 Untersuchungen an 78 Nichtdiabetikern 0.06 bis 0.12%, im Durchschnitt 0.088%, betrug.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Bei Untersuchungen an 52 Nichtdiabetikern — Gesunde und Kranke, deren Krankheit mit dem Schwellenwerte nichts zu tun haben scheint — schwankte der Schwellenwert zwischen 0.08 und 0.21%. In den meisten Fällen betrug er 0.13 bis 0.19%, indem die Werte 0.14–0.17% besonders häufig dabei beobachtet wurden. Die Werte unter 0.12% oder über 0.20% kamen nur selten vor.

2. Zwischen dem Schwellenwerte von Diabetikern und Nichtdiabetikern gibt es keinen auffallenden Unterschied. Aber man kann nicht ganz übersehen, dass die höheren Schwellenwerte beim Zuckerkranken und die niedrigeren beim Nichtdiabetiker häufiger beobachtet werden, was wohl darauf hindeutet, dass die Schwelle beim Zuckerkranken im grossen und ganzen höher liegt als beim Nichtdiabetiker.

3. Die Assimilationsfähigkeit des Nichtdiabetikers für Kohlenhydrat ist bei Personen mit niedrigerem Schwellenwerte im allgemeinen kräftiger als bei denen mit einem höheren, so dass die alimentäre Hyperglykämie dort trotz grösserer Kohlenhydratzufuhr relativ in geringerem Grade zustande kommt, während sie hier bei kleinerer Kohlenhydrataufnahme weit stärker in die Erscheinung tritt.

4. Die scheinbar paradoxe Erscheinung, dass Sakaguchi und seine Mitarbeiter am Gesunden bei gewöhnlichem Leben häufig eine deutliche alimentäre Hyperglykämie, aber nur selten dabei die Glykosurie beobachteten, während die Personen mit niedrigerem Schwellenwerte nach meiner Untersuchung gar nicht gering sind, lässt sich dadurch ganz leicht erklären, dass bei Fällen mit niedrigerem Schwellenwerte die alimentäre Blutzuckersteigerung wegen der kräftigen Assimilationsfähigkeit relativ geringfügig ist und bei Fällen, wo eine starke Hyperglykämie nach dem Essen häufig auftritt, der Schwellenwert gerade hoch liegt und infolgedessen der Schwellenwert beim Nichtdiabetiker im allgemeinen

nur selten überschritten wird.

5. Das Geschlecht scheint mit der Höhe der Schwelle nichts zu tun haben (Bei meiner Untersuchung wurden Schwangere und Wöchnerinnen ausgeschlossen).

6. Der Schwellenwert scheint bei älteren Leuten etwas höher zu sein als bei jüngeren, obwohl der Unterschied nicht auffallend ist.

7. Bei 202 Untersuchungen an 78 Nichtdiabetikern betrug der Blutzuckergehalt im morgens nüchternen Zustande 0.06 bis 0.12%, durchschnittlich 0.088%.

LITERATUR.

Bailey, C. V. (1919): Arch. of int. Med., **23**, 455.

Faber, K. et Norgard, A. (1920): Cpt. rend. des seances da la soc. de biol., **83**, 495.

Hamman and Hirschmann, (1917): Arch. of int. Med., **20**, 761.

Goto, K. und Kuno, N. (1920): Mitteil. d. med. Gesellsch. zu Tokio, **34**, Nr. 11.

Jacobson, A. Th. (1913): Bioch. Zeitsch., **56**, 471.

Liefmann, E. u. Stern, (1906): Bioch. Zeitsch., **1**, 297.

v. Noorden, (1910): Die Zuckerkrankheiten, 5. Aufl. S. 107.

Ono, B. (1923): Chugai Iji Shimpo, **1028**.

Sakaguchi, K., Matsuyama, T. u. Nakayama, M.: Mitteil d. med. Fakultät d. Kaiserl. Universität zu Tokio.

ÜBER DEN EINFLUSS DES SALZES UND DES GLOBULINS AUF DAS AGGLUTINATIONSPHÄNOMEN.

Von

TAKUJI SHIONOYA.

(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Kinnosuke Miura, Kaiserliche Universität zu Tokio.)

(Eingegangen am 20. Januar 1924.)

I. Einfluss des Salzes auf Bakterienagglutination.

Obwohl das Phänomen der Agglutination seit seiner Entdeckung mehrfach studiert worden ist, bleiben noch Punkte übrig, die einer besseren Erklärung bedürfen. Im Jahre 1899 gab Bordet als erster an, dass zum Zustandekommen der Agglutination nicht nur Agglutinin und entsprechende Bakterien unbedingt notwendige Faktoren sind, sondern auch das Salz als ein dritter Faktor ausschlaggebend ist. Er hat nachgewiesen, dass wenn das Salz dem Serum und der Bakteriensuspension durch Dialyse entzogen wird und dann die beiden gemischt werden, das Phänomen nicht mehr erscheint; sobald man aber eine Spur von Chlornatrium hinzusetzt, kommt es plötzlich zum Vorschein. Seiner Meinung nach wirkt das Agglutinin erst bei der Anwesenheit von Salzen auf Bakterien oder Zellen ein, und es tritt eine Veränderung der molekulären Attraktion und sekundäre Hemmung der molekulären Bewegung, Konglomeratbildung und somit Ausflockung auf.

Joos (1901) fand, dass wenn kochsalzfreie Bakterien und kochsalzfreies Agglutininserum miteinander gemischt werden, die Agglutination nicht zu Stande kommt. In diesen salzfreien Gemengen haben die Bakterien jedoch das Agglutinin aufgenommen, was dadurch bewiesen wird, dass die Bakterien sich agglutinieren und ausgeflockt werden, sobald man sie vom Serum befreit und in eine Kochsalzlösung bringt. Die geringe Abnahme des Salzes in der überstehenden Flüssigkeit führt Joos (1902) auf eine chemische Bindung der agglutinierenden und agglutinablen Substanz mit dem Salze zurück.

Friedberger (1901–1902) bestätigte zwar Joos, insofern als die Zufuhr von Kochsalz zur Agglutination dialysierter Kulturen notwendig ist, negierte aber eine chemische Bindung, da auch bei Verwendung von Körpern (Traubenzucker, Asparagin), für die eine chemische Bindung an das Bakterium mit Sicherheit auszuschliessen ist, die Agglutination eintritt. Joos führte noch weiter aus, dass ausser Kochsalz auch die meisten Alkali- und Erdalkalisalze die Verbindung eingehen und Agglutination hervorrufen. Unter den Salzen einer und derselben Reihe gibt es jedoch Unterschiede, indem sich die Agglutination in den Chloridlösungen rascher vollzieht als in denen des Jodids oder Bromids; es scheint, dass das Salz durch sein Säureradikal wirkt. Die Salze zweier verschiedener Metalle zeigen häufig keinen Unterschied, z. B., KCl erzeugt die Agglutination in derselben Weise wie NaCl oder NH_4Cl, dasselbe gilt für NaBr, KBr und NH_4Br, für NaJ, KJ und NH_4J.

Während Altobelli und Memmo (1902) nur Vermutungen aufstellten, in welcher Weise die Mineralsubstanzen von Bedeutung für die Agglutination wären: durch Fällung der Proteine, Beeinflussung der Osmose oder Änderung der Molekularattraktion und Adhäsion, haben Neisser und Friedemann (1904), Bechhold (1904), Friedemann die Rolle der Salze für unorganisierte und für Bakteriensuspensionen genauer studiert. Sie stellten die Schwellenwerte fest, d. i. jene geringste Salzkonzentration, bei welcher nach 24 Stunden noch die Ausflockung erfolgt. Es ergab sich, dass keinp rinzipieller Unterschied zwischen der Ausflockung von Bakterien, Agglutininbakterien und unorganisierten Suspensionen bzw. Kolloiden besteht. Bakterien werden durch Säuren und durch die Salze der Schwermetalle in sehr geringer Konzentration gefällt, während die Salze der Alkalien und Erdmetalle erst in ausserordentlich hoher Konzentration wirksam sind; hierin verhalten sie sich wie Eiweisskörper und werden auch durch Nichtelektrolyte wie Alkohol Formalin gefällt. Dabei steht der Schwellenwert der Salze in einer gewissen Relation mit der Entladungsspannung der Metalle; die Kationen mit niedriger Entladungsspannung besitzen ein hohes, die mit hoher Entladungsspannung ein sehr geringes Fällungsvermögen; doch gibt es auch Unregelmässigkeiten in der Reihe, die Relation ist deutlich bei den einwertigen, weniger bei den zweiwertigen und fehlt schon bei den dreiwertigen Kationen.

Ganz anders verhalten sich die mit Agglutinin beladenen Bakterien, indem diese wie unorganisierte echte Suspensionen schon durch geringe Salzkonzentrationen ausgeflockt werden.

Salze, die wie NaCl, Na_2SO_4, $MgSO_4$ in den stärksten Konzentrationen Bakterien nicht fällen, flocken Agglutininbakterien schon in geringer Konzentration aus, was von Buxton und Teague (1906) bestätigt wurde. Säuren besitzen für beide dasselbe, die Schwermetallsalze ein mässig stärkeres Fällungsvermögen für die Agglutininbakterien. Agglutininbakterien verhalten sich wie unorganisierte echte Suspensionen. Es ist also die Wirkung der Salze auf Agglutininbakterien im Sinne Bordets (1899) aufzufassen, analog der Salzfällung suspensierter Tonpartikel.

Wahrscheinlich wird durch die Aufnahme des Agglutinins die Suspension der Bakterien viel labiler und wird durch gewisse Menge der Salze ausgeflockt.

Über den Einfluss der Wertigkeiten der Kationen machte Porges (1905) folgende Versuche: die durch Dialyse chlorfrei gemachte Aufschwemmung von Typhusbazillen und Typhusimmunpferdeserum wurde mit einer Anzahl von Salzen beigemengt und dann die geringste Salzkonzentration abgelesen, wobei noch Agglutination auftrat. Zunächst wurden der Reihe nach Anionen bei gleichem Kation studiert und in der Wirkung von Cl', NO_3' und SO_4'' nur kleine Differenzen gefunden, so dass sich ihr Fällungsvermögen als annähernd gleich annehmen lässt. Ebenso war das Ausflockungsvermögen von $Na^{\cdot}$, $K^{\cdot}$ und $NH_4^{\cdot}$ bei gleichem Anion ungefähr dasselbe. Dagegen ist das $Mg^{\cdot\cdot}$ ungefähr 10 mal so wirksam als die übrigen einwertigen Metallionen. Es ergibt sich daraus, dass die Wertigkeit des Kations für das Ausflockungsvermögen von ausschlaggebender Bedeutung ist, was schon Neisser und Friedemann sowie Bechhold festgestellt hatten.

Die Versuche der Kationen mit mehr als drei Wertigkeiten wurden bisher von niemandem ausgeführt und die Rolle der Kationen in der Agglutination nicht erklärt.

Um den Effekt der Salzionen im Agglutinationsmechanismus zu prüfen, habe ich nach der Anregung von meinem Chef, Herrn Prof. K. Miura, folgende Methode angewandt.

A. Suspension der Agglutininbakterien.

Um salzfreie Suspension von Agglutininbakterien zu gewinnen, wurde folgende Methode angewandt:—

10 Schiefagarkulturen von Typhusbazillen, welche 16 bis 24 Stunden gewachsen sind, werden vorsichtig in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, mit 1 ccm von Typhusimmunpferdeserum, dessen Agglutinationstiter 1 : 10000 ist, beigemischt, geschüttelt und 30 Minuten im Brütschrank (37°C) stehen gelassen, um Agglutinin und Bakterien binden zu lassen. Das Agglutinat wird sofort mittelst der Zentrifuge mehrere Male mit destilliertem Wasser gewaschen, endlich in 40 ccm destilliertes Wasser verteilt, dann in den Dialysator hineingelegt und nach Toluolzusatz 5 Tage lang gegen strömendes Leitungswasser, 2 Tage lang gegen destilliertes Wasser dialysiert. Dann wird eine grauweisslich diffus getrübte Suspension von Agglutininbakterien gewonnen, welche sich zum Experiment eignet.

In einigen Reihen von Reagenzröhrchen, welche durch Kochen mit Wasser von Alkalien und Elektrolyten befreit worden und getrocknet sind, wird je 1 ccm von Salzlösungen in verschiedenen Konzentrationen eingegossen und mit 1 Tropfen der Agglutininbakteriensuspension (ein Tropfen enthält ca. eine Normalöse Typhusbazillen) beigemengt, gut geschüttelt ; das Ganze wird 2 Stunden im Brütofen bei 37°C und dann 18 Stunden in der Zimmertemperatur stehen gelassen.

Die geringste Konzentration, bei welcher noch Agglutination auftritt, wird abgelesen ; in höherer Konzentration als Schwellenwert werden die Agglutininbakterien als grobe Flocken niedergeschlagen, und die überstehende Flüssigkeit wird klar, während in geringeren Konzentrationen keine Flockenbildung vorkommt und beim leichten Schütteln diffuse Trübung auftritt, obwohl ein Teil zuweilen spontan sedimentiert.

B. Salze.

Nach Matsuno (1918), der die Wirkung der Kationen gegen das Arsensulfidkolloid, ein negatives anorganisches Kolloid, studierte, können gewöhnliche Salze zur Untersuchung des Ioneneffektes kein geeignetes Material sein, was ich auch in meinen Experimenten erfuhr. Zum Beispiel ist der Schwellenwert des Kupfersulfates ganz anders als andere Salze von zweiwertigen Kationen. Es ist denkbar, dass dies Salz in wässeriger Lösung nicht nur wie $CuSO_4 \rightleftarrows Cu^{\bullet\bullet} + SO_4''$, dissoziiert ist, sondern auch ein Teil davon hydrolytische Spaltung erfährt und Säuren und komplexe Verbindungen bildet, da die wässerige Lösung desselben schwach saure Reaktion gegen Lackmus zeigt :

$$2CuSO_4 + 2H_2O \rightleftarrows Cu_2(OH)_2SO_4 + H_2SO_4.$$

Auch bei Aluminiumsulfatlösung findet sich in gewisser Konzentration eine Zone nach Neisser u. Friedemann (1904) und Burton (1905), wo die Agglutination oder Ausflockung gehemmt wird. Nach Burton (1905) soll $PtCl_4$ in wässeriger Lösung keinen Effekt des 4-wertigen Kations zeigen. Salze mit 4- und mehrwertigen Kationen sind schwer zu finden, doch wären Versuche mit solchen Salzen wünschenswert.

Unter den Kobaltkomplexen finden sich Salze mit 1– bis

6-wertigen Kationen, nur die mit 5-wertigen werden nicht gefunden. Herr Y. Shibata, Professor der Chemie an der kaiserl. Universität zu Tokio, der mehrere Arbeiten über diese Komplexe veröffentlichte, hatte die Güte, mir die wertvollen Komplexe von Kobalt zu übergeben; nur dadurch war ich im Stande, mehrere der nachstehenden Komplexsalze mit 1- bis 6-wertigen Kationen zum Experimente heranzuziehen, deren wässerige Lösung neutrale Reaktion zeigt.

TABELLE I.

A) Die geringste Konzentration der gewöhnlichen Salze, wobei noch Agglutination auftritt.

a) Salze mit einwertigen Kationen	Schwellenwert (Äquival.)
NaCl	$\frac{1}{100}$
KCl	$\frac{1}{100}$
KNO_3	$\frac{1}{100}$
$NaNO_3$	$\frac{1}{100}$
Na_2SO_4	$\frac{1}{100}$
b) Salze mit zweiwertigen Kationen	
$MgSO_4$	$\frac{1}{2000}$
$Ba(NO_3)_2$	$\frac{1}{2000}$
$CoCl_2$	$\frac{1}{2000}$
$Cu(NO_3)_2$	$\frac{1}{10000}$
$CuSO_4$	$\frac{1}{10000}$

c) Salze mit dreiwertigen Kationen

$Al_2(SO_4)_3$	$\frac{1}{20000}$
$Al_2(NO_3)_6$	$\frac{1}{20000}$
$Cr_2(SO_4)_3$	$\frac{1}{19000}$

B) Schwellenwerte der Kobaltkomplexe bei Agglutination.

a) Salze mit einwertigen Kationen	Schwellenwert (Äquival.)
$[Co(NH_3)_4(NO_2)_2]Cl$	$\frac{1}{150}$
$[Co(NH_3)_4(CO_3)_2]_2SO_4$	$\frac{1}{150}$
Durchschnittlich	$\frac{1}{150}$
b) Salze mit zweiwertigen Kationen	
$[Co(NH_3)_5Cl]Cl_2$	$\frac{1}{2000}$
$[Co(NH_3)_5NO_2]Cl_2$	$\frac{1}{2000}$
$[Co(NH_3)_4 \cdot H_2O \cdot Cl]Cl_2$	$\frac{1}{1500}$
Durchschnittlich u. abgerundet	$\frac{1}{2000}$
c) Salze mit dreiwertigen Kationen	
$[Co(NH_3)_5H_2O]Cl_3$	$\frac{1}{10000}$
$[Co(NH_3)_6](NO_3)_3$	$\frac{1}{10000}$

$[Co(NH_3)_6]Cl_3$	$\frac{1}{10000}$
Durchschnittlich	$\frac{1}{10000}$
d) Salz mit vierwertigem Kation	
$\left[\begin{matrix}(NH_3)_4\\H_2O\end{matrix}>CoNH_2CO<\begin{matrix}Cl\\(NH_3)_4\end{matrix}\right]Cl_4$	$\frac{1}{30000}$
e) Salze mit sechswertigen Kationen	
$[Co[Co(NH_3)_4(OH)_2]_3](SO_4)_3$	$\frac{1}{100000}$
$[Co_4(OH)_6(NH_3)_{12}]Cl_6$	$\frac{1}{100000}$
Durchschnittlich	$\frac{1}{100000}$

Die Ursache der Ausflockung sehen Hardy (1899), Bredig (1901), Wetham, Neisser u. Friedemann (1904) sowie Bechhold (1906) in einer elektrischen Zustandsänderung. Die Tatsachen, auf denen die Vorstellungen dieser Forscher basieren, sind durch die Untersuchungen von Picton u. Linder (1897) begründet worden, die gefunden haben, dass Kolloide, die sich ausflocken, im elektrischen Strome eine entgegengesetzte Wanderungsrichtung zeigen. Hardy (1899) konnte nachweisen, dass ausgeflockte Kolloide elektrisch neutral sind, woraus sich ergibt, dass es bei der Ausflockung zu einer elektrischen Entladung kommt, also dass negativ beladenes Kolloid durch Kationen der Elektrolyte zum Zusammenballen der Partikelchen gebracht und endlich gefällt wird, während die durch die Dissoziation freigewordenen Anionen für den Vorgang keine wesentliche Bedeutung besitzen. Bei der Agglutinationserscheinung ist es fast dasselbe, nämlich die Schwellenwerte der Agglutination derselben Kationen mit verschiedenen Anionen sind fast gleich. Eine exakte Bestimmung des Grenzwertes ist so schwer durchführbar, dass jedenfalls auch grosse Differenzen zu berücksichtigen sind.

Es ist daher klar, dass das Kation ausser Agglutinin und Bakterien ein dritter für die Agglutination notwendiger Faktor ist. Wie steht nun die Wertigkeit der Kationen zur Agglutination? Aus der Voraussetzung, dass ein-, zwei- und dreiwertige Kationen alle in denselben Verhältnissen Kolloidpartikelchen adsorbieren und dadurch die Neutralisation erzielen, berechnete Freundlich (1910) die für die vollständige Ausflockung des Kolloides notwendigen und genügenden Konzentrationen der Salze aus der Adsorptionskurve und bekam die naheliegenden Werte der Konzentrationen der vollständigen Ausflockungen. Stehen die Ladungen der ein-, zwei- und dreiwertigen Ionen im Verhältnis von 1 : 2 : 3, so muss die für die vollständige Ausflockung notwendige Salzmenge sich wie $1 : \frac{1}{2} : \frac{1}{3}$ verhalten, d. h. die logarithmische Kurve stellt eine gerade Linie dar. Die Resultate seiner Experimente in bezug auf die Ausflockung der Arsensulfid- und Platinkolloide zeigte die Beziehung als geradlinig. Matsuno (1918), beim Studium der durch die Kobaltamine hervorgerufenen Koagulation von Schwefelarsenkolloid, stellte folgende Gleichung auf:

$$\ln S_n + \beta \ln n + \alpha = 0$$

Bei meinen Experimenten von Agglutination der Agglutininbakteriensuspension durch die Kobaltkomplexsalze fand ich auch, dass dazwischen gleiche Beziehung besteht.

Wir setzen bei der Agglutination

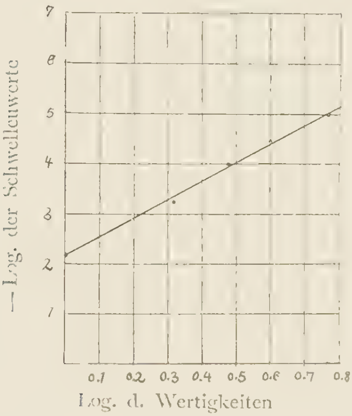
$$\ln S_n + \beta \ln n + \alpha = 0 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

wo S_n Konzentration des n-wertigen Ions, α und β Konstanten sind.

Wenn $n=1$,

$$-\ln S_1 = \alpha$$

Fig. 1.



Es folgt aus der Gleichung (1)

$$\ln S_n + \beta \ln n - \ln S_1 = 0 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

oder

$$\ln S_n = \ln S_1 - \beta \ln n \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (3)$$

Der Wert von β kann aus folgender Gleichung berechnet werden:

$$\beta = \frac{\ln S_1 - \ln S_n}{\ln n}.$$

Also ist β für das 2-wertige Ion	3.733
,, ,, 3- ,, ,,	3.620
,, ,, 4- ,, ,,	3.821
,, ,, 6- ,, ,,	3.628
Durchschnittlich	3.7

Wird $\beta = 3.7$ in die Gleichung (3) gesetzt, so folgt:

$$\ln S_n = \ln S_1 - 3.7 \ln n.$$

Nun kann man die berechneten Werte der S_n und die experimentellen Resultate vergleichen.

Valenz	Schwellenwert, Sn (Äquival.)	
	gefunden	berechnet
1	$\frac{1}{150}$	—
2	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{1950}$
3	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{8738}$
4	$\frac{1}{30000}$	$\frac{1}{25336}$
5	—	—
6	$\frac{1}{100000}$	$\frac{1}{113568}$

Die Schwellenwerte der Kobaltkomplexsalze in der Agglutination zeigen also Übereinstimmung zwischen empirischen und berechneten Zahlen.

Obwohl die Bakterien allein durch $MgSO_4$ und Na_2SO_4 nicht ausgeflockt werden, so verhalten sie sich wie anorganisches negatives Kolloid, wenn sie erst mit Agglutinin beladen werden, und werden durch bestimmte Menge von Kationen ausgeflockt, sei es einfache oder komplexe, und folgen wie ein anorganisches Kolloid dem Gesetz der chemischen Valenzen. Die Einflüsse von Anionen kommen kaum in Betracht, da die Mehrzahl der angewandten Komplexsalze des Kobaltes das Chlor als Anion gehabt haben. Die Beziehung zwischen den Valenzen und den geringsten ausflockenden Ionenkonzentrationen richtet sich nach der Gleichung ersten Grades:

$$\ln S_n + \beta \ln n + \alpha = 0.$$

II. EINFLUSS DES SALZES AUF HÄMAGGLUTINATION

Rona und Gyorgy (1920) liessen auf die Menschenblutkörperchen Ricin (Kobert) einwirken, welches ein vegetabilisches Agglutinin ist, und prüften diejenige Konzentration, wobei Agglutination auftrat. Sie fanden dass die Ricinagglutination der Blutkörperchen ausschliesslich in Gegenwart von Elektrolyten erfolgt und dass in bezug auf die fällende Kraft eine Kationen- und weniger ausgeprägt eine Anionenreihe aufgestellt werden konnte, indem die Wirksamkeit der Kationen mit der Wertigkeit wächst. Aber es handelt sich hier darum, in spezifischer Hämagglutination die Ioneneffekte der Salze zu prüfen, in deren Lösungen die Salze möglichst vollkommen dissozieren, ohne irgendein Hindernis zu zeigen.

Eigene Experimente.

Ein gesundes Kaninchen (Körpergewicht 2230 g) wurde mit defibriniertem Menschenblut mittelst 3-maligen intravenösen Injektionen behandelt. Am 14. Tage nach der letzten Injektion ist der Agglutinationstiter des Serums für einen Tropfen von 25%igem Menschenblut 1 : 800. Sofort ist die ganze Menge Blut entnommen. Das Immunserum wurde 5 Tage gegen das Leitungswasser, 2 Tage gegen destilliertes. Wasser dialysiert und dann entsalztes Immunserum zum Experiment angewandt. Der grösste Teil des Agglutinins wurde mit Globulin gefällt, der Agglutinintiter des überstehenden Serums war 1 : 160. Die roten Blutkörperchen von gesunden Menschen wurden in 8%iger Rohrzuckerlösung mehrmals in Zentrifuge gewaschen. 20 ccm von 25%iger Menschenblutaufschwemmung wurde mit 10 ccm entsalztem Hämagglutininserum gemischt, 30 Minuten im Brutschrank (37°C.) stehen gelassen, dann wurde das Gemisch mit 8%iger Rohrzuckerlösung mittelst Zentrifuge 4-mal gewaschen und in der Weise wurde eine 25%ige Aufschwemmung von mit Hämagglutinin beladenen Menschenblutkörperchen gewonnen. Die Salze wurden in der 8%igen Rohrzuckerlosung in verschiedenen Konzentrationen gelöst. In je 1 ccm von verschieden konzentrierter Salzlösung wurde ein Tropfen von dieser Hämagglutininerythrozytensuspension hinzugefügt, gut geschüttelt, 2 Stunden im Brutschrank und 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und die geringste Salzkonzentration abgelesen, wo noch die Hämagglutination auftrat. Als Rohrzucker wurde ganz reiner krystallisierter Rohrzucker angewandt, weil amorpher Rohrzucker schon ohne Salzbeimengung die Suspension ausflockte. Bei einigen Salzen sah man in gewissen Konzentrationen Hämolyse auftreten, so z. B. bei Aluminiumnitrat in den Konzentrationen von 1/10 bis 1/200 und bei Aluminiumsulfat in solchen von 1/10 bis 1/80, während bei frischen Lösungen von unten zu erwähnenden Kobaltkomplexen in fast allen Konzentrationen gar keine Hämolyse zum Vorschein kam.

TABELLE II.

A) Die Schwellenwerte der Hämagglutination der gewöhnlichen Salze.

a) Salze mit einwertigen Kationen	Schwellenwert (Äquival.)
NaCl	$\frac{1}{100}$
KCl	$\frac{1}{100}$
KNO_3	$\frac{1}{80}$
$NaNO_3$	$\frac{1}{80}$
Na_2SO_4	$\frac{1}{400}$
b) Salze mit zweiwertigen Kationen	
$MgSO_4$	$\frac{1}{1000}$
$MgCl_2$	$\frac{1}{2000}$
$CoCl_2$	$\frac{1}{2000}$

$CuSO_4$	$\frac{1}{20000}$
$Cu(NO_3)_2$	$\frac{1}{10000}$

c) Salze mit dreiwertigen Kationen.

$Al_2(SO_4)_3$	$\frac{1}{24000}$
$Al_2(NO_3)_6$	$\frac{1}{14000}$
$Cr_2(SO_4)_3$	$\frac{1}{14000}$

B) Schwellenwerte der Komplexsalze bei der Hämagglutination.

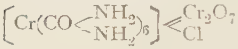
a) Komplexsalze mit monovalenten Kationen	Schwellenwert (Äquival.)
$[Co(NH_3)_4(NO_2)_2]Cl$	$\frac{1}{150}$
$[Co(NH_3)(CO_3)_2]_2SO_4$	$\frac{1}{150}$
$[Co(NH_3)_4(C_2O_4)]Cl$	$\frac{1}{150}$
$[Co\left(\begin{matrix}CH_2{-}NH_2\\ \vert\\ CH_2{-}NH_2\end{matrix}\right)_2 SO_4]Cl\cdot\frac{1}{2}H_2O$	$\frac{1}{160}$
Durchschnittlich	$\frac{1}{150}$

b) Komplexsalze mit zweiwertigen Kationen

$[Co(NH_3)_5Cl]Cl_2$	$\frac{1}{2000}$
$[Co(NH_3)_5NO_2]Cl_2$	$\frac{1}{2000}$

$[Co(NH_3)_4H_2O \cdot Cl]Cl_2$	$\frac{1}{4000}$
Durchschnittlich	$\frac{1}{2400}$

c) Komplexsalze mit dreiwertigen Kationen

$[Co(NH_3)_5H_2O]Cl_3$	$\frac{1}{10000}$
$[Co(NH_3)_6]Cl_3$	$\frac{1}{10000}$
$[Co(NH_3)_5(H_2O)_3]Cl_3$	$\frac{1}{10000}$
 $\left[Cr\left(CO<\begin{matrix}NH_2\\NH_2\end{matrix}\right)_6\right]<\begin{matrix}Cr_2O_7\\Cl\end{matrix}$	$\frac{1}{20000}$
$[Co(NH_3)_6](NO_3)_3$	$\frac{1}{8000}$
Durchschnittlich u. abgerundet	$\frac{1}{10000}$

d) Komplexsalz mit vierwertigem Kation

$\left[\begin{matrix}(NH_3)_4\\H_2O\end{matrix}>CoNH_2Co<\begin{matrix}Cl\\(NH_3)_4\end{matrix}\right]Cl_4$	$\frac{1}{32000}$

e) Komplexsalze mit sechswertigen Kationen

$[Co[Co(NH_3)_4(OH)_2]_3](SO_4)_3$	$\frac{1}{100000}$
$[Co_4(OH)_6(NH_3)_{12}]Cl_6$	$\frac{1}{140000}$
Durchschnittlich	$\frac{1}{116667}$

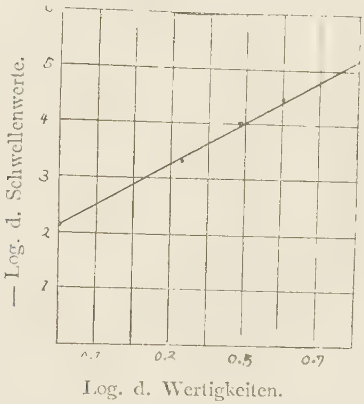
Theoretisches.

Setzt man bei der Hämagglutination die Logarithmen der geringsten ausflockenden Konzentrationen der Komplexsalze als

Ordinate und die Wertigkeiten als Abscisse, so bekommt man eine gerade Linie, die durch folgende Gleichung ausgedrückt werden kann:

$$\ln S_n + \beta \ln n + \alpha = 0$$

Fig. 2.



β wird aus

$$\beta = \frac{\ln S_1 - \ln S_n}{\ln n}$$

wie folgt berechnet:

für 2-wertige Kationen	4.00
,, 3- ,, ,,	3.82
,, 4- ,, ,,	3.86
,, 6- ,, ,,	3.71
Durchschnittlich	3.85

Wird die abgerundete Zahl in die Gleichung statt β umgestellt, so folgt

$$\ln S_n = \ln S_1 - 3.9 \ln n.$$

Die empirischen und die berechneten Schwellenwerte sind wie folgt:

Wertigkeit	Schwellenwert (Äquival.)	
	gefunden	berechnet
1	$\frac{1}{150}$	—
2	$\frac{1}{2400}$	$\frac{1}{2239}$
3	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{10886}$
4	$\frac{1}{32000}$	$\frac{1}{33433}$
6	$\frac{1}{116667}$	$\frac{1}{162515}$

Daraus ist zu entnehmen, dass die Hämagglutination sich ebenso verhält wie die Agglutination der Bakterien und dass sie beide den gleichen Gesetzen folgen.

III. Einfluss des Globulins als hemmender Faktor gegenüber Agglutination und Hämolyse.

Nach Adrenalininjektion fand ich zufällig Wassermannsche Reaktion in den Seris von gesunden Menschen positiv.* Durch weitere Experimente wurde jedoch klar, dass diese Reaktion keine echte positive ist, sondern eine Steigerung antikomplementärer Wirkung.

Das Normalserum selbst kann in verschiedenen Fällen antihämolytisch wirken. Beobachtungen dieser Art rühren schon von P. Th. Müller (1901), Ehrlich und Morgenroth (1900–1901), Neisser und Doering (1901), Marschall und Morgenroth (1902) u. a. her. Die Ursache dieser antihämolytischen Serumwirkung kann mannigfaltiger Natur sein. Bordet und

---

* Dies habe ich schon im April 1922 im der Japanischen Dermatologischen Gesellschaft zu Kioto veröffentlicht.

Gay (1908) wollen die antikomplementäre Wirkung normaler Sera im allgemeinen als eine antireaktive aufgefasst wissen, d. h. als die Folge einer einfachen Hemmung des Verbindungsbestrebens zwischen ambozeptorbeladener Zelle und Komplement.

Besonders beachtenswert erscheinen die Untersuchungen U. Friedemanns über die antagonistischen Serumwirkungen. Er ist nämlich bestrebt, die Wirkung der antagonistischen Substanzen auf ein von ihm für zahlreiche antikomplementäre Wirkungen verallgemeinertes Prinzip, die antikomplementäre Globulinwirkung, zurückzuführen. Da aber in vielen Fällen die Globulinwirkung durch die Albuminwirkung aufgehoben werden kann, so müssen die Mischungsverhältnisse des Globulins und des Albumins im Serum auch in diesem Fall in Betracht kommen.

1. Änderung der Mischungsverhältnisse der Serumeiweissfraktionen bei Adrenalin- und Pilokarpininjektion.

Rohrer (1917) publizierte im Jahre 1917 eine Methode, nach welcher aus Refraktion und Viskosität des Serums das Mischungsverhältnis des Albumins und Globulins im Serum zu berechnen ist. In der letzten Zeit fand Mozai (1921) einen Fehler in der Kurve Rohrers, wenn auch das Prinzip richtig ist. Ich habe diese modifizierte Kurve zur Berechnung benutzt.

Eigene Experimente.

Wurde Menschen 0.7 ccm von 0.1%iger Adrenalinlösung subkutan injiziert, so war 2 Stunden darnach die antikomplementäre Serumwirkung ziemlich deutlich zu konstatieren, aber bei Tieren war relativ grössere Dosis Adrenalin notwendig, z. B. für Kaninchen pro kilo Gewicht 0.5 bis 1 ccm, für Meerschweinchen 0.7 bis 1 ccm, um den Zweck zu erreichen. Wegen dieser grösseren Adrenalindosis konnten die Tiere nicht länger als 5 bis 10 Stunden leben.

TABELLE III.

Tier	Körpergewicht g	Arznei	Arzneidosis (ccm) subkutan	Zeit der Blutentnahme	Viskosität des Serums	Refraktion (Skalenteil) des Serums	Gesamteiweiss des Serums (%)	Globulinteil des Gesamteiweisses (%)	Albuminteil des Gesamteiweisses (%)
Kaninchen	2550	1‰ Adrenalin	0.7	vor	1.79	57.0	7.63	43.0	57.0
				nach 1 St.	1.85	58.0	7.86	47.0	53.0
				2 St.	1.86	57.6	7.76	50.0	50.0
Kaninchen	2500	,,	0.5	vor	1.86	62.0	8.71	30.0	70.0
				nach 2 St.	1.63	49.0	6.01	55.0	45.0
Kaninchen (antityphoid-immunisiert)	2200	,,	1.1	vor	1.87	55.2	6.14	63.0	37.0
				nach 2 St.	1.76	52.7	6.49	67.0	23.0
				5 St.	1.74	50.6	6.23	72.0	28.0
Meerschweinchen	730	,,	0.5	vor	1.69	56.3	7.48	30.8	69.2
				nach 1 St.	1.87	59.3	8.13	42.5	57.5
				2 St.	1.64	50.5	6.22	50.0	50.0
,,	300	,,	0.3	vor	1.62	51.0	6.33	43.0	57.0
				nach 2 St.	1.53	47.0	5.45	49.0	51.0
,,	250	,,	0.25	vor	1.68	54.0	6.98	30.0	70.0
				nach 2 St.	1.61	50.0	6.12	47.0	53.0
,,	300	1% Pilocarpin	0.3	vor	1.43	45.0	5.03	31.4	68.6
				nach 2 St.	1.53	46.1	5.27	53.0	47.0
,,	650	,,	0.5	vor	1.54	48.5	5.79	41.0	59.0
				nach 2 St.	1.64	50.1	6.14	54.0	46.0
				4 St.	1.63	50.0	6.12	52.0	48.0

Auch bei den Tieren, denen subkutan 1% Pilokarpinlösung in grösseren Dosen injiziert worden war, konnte ich dieselben Mischungsverhältnisse des Serumeiweisses und auch gesteigerte antikomplementäre Serumwirkung wie nach der Adrenalininjektion konstatieren. Hier musste auch die injizierte Pilokarpindosis sehr gross sein, um pseudopositive Wassermannsche Reaktion hervorzurufen, und die Tiere endeten nach einigen Stunden letal.

Man sieht, dass einige Stunden nach der Adrenalin- und Pilokarpininjektion der Prozentgehalt des Globulins deutlich zunimmt und der Albuminanteil dementsprechend abnimmt, während die absolute Eiweissmenge bald zu- bald abnimmt oder unverändert bleibt.

2. Einfluss der Adrenalininjektion auf die Wassermannsche Reaktion.

Im Jahre 1914 haben Hirschfeld und Klinger (1914) Versuche unternommen, den kolloidalen Zustand des Serums und dadurch die Immunitätsreaktion zu ändern, in der Weise, dass sie es längere Zeit schüttelten oder mit destilliertem Wasser verdünnten, wodurch eine vorher deutlich positive Reaktion später negativ wird, indem die Stabilität der Globuline erniedrigt wird. Bruck versetzte negative Sera mit Organen und erhielt dadurch positive Reaktionen; zu den gleichen Ergebnissen gelangten Röminger und v. Dungern durch Verwendung bestimmter Fettsäuren, während Much und Emden durch Einspritzen von Aminosäuren das gleiche Resultat beobachten konnten. Much und Schmidt stellten Untersuchungen an, um die Lipoidwirkung nachzuweisen, und kamen zu folgenden Resultaten: sie injizierten Kaninchen reines Tuberkelbazillenlipoid in einer Verdünnung 1 : 10000 intravenös und erhielten vier Stunden nach der Injektion bei dem früher Wassermann-negativen Serum eine positive Probe mit 0.1 ccm Serum, die nach zweimal 24 Stunden in eine negative umschlug. Eine ebenfalls positive Reaktion bei vorher negativem Serum trat ein durch Leuzineinspritzung. Ferner injizierten sie einem seropositiven Kaninchen Quecksilber intravenös, was eine erst verstärkt positive, nach drei Tagen schon schwächere Probe ergab. Im Februar 1922 teilte K. **Bauer** mit, dass durch eine Digitalismedikation unter Umständen eine negative Wa. R. oder D. M. positiv werden kann, trotzdem keine Lues besteht.

Ich hatte gefunden, dass 1 Stunde bis 1 Tag nach einer Adrenalininjektion (0.7–0.8 ccm von 1 promilliger Lösung) bei Luetikern stärkere positive Wassermannsche Reaktion als vorher, bei non-syphilitischen Menschen schwächere positive beobachtet werden.

TABELLE IV.

Fall Nr.	Kl. Diagnose	Adrenalindosis (ccm)	Resultate der Wa. R. (Serum 0.1 ccm)				
			Vor. d. Inj.	Nach d. Inj.			
				1 St.	2 St.	24 St.	48 St.
1	♂ Verdacht auf Rückenmarkstumor	0.8	—	±	+	0	0
2	♂ Latente Lues, nach 11 maliger Salvarsanbehandlung	0.8	+	++	++	0	0
3	♂ Tabes dorsalis	0.8	++++	0	++++	0	0
4	♀ Solitärtuberkel mit Jacksonscher Epilepsie	0.7	±	0	++	0	0
5	♀ Lues, nach Salvarsanbehandlung	0.7	—	++	0	+	—
6	♂ Beriberi	0.5	—	—	—	0	0
7	♂ Derselbe Patient	0.7	—	+	+	0	0
8	♀ Asthma bronchiale	0.8	—	+	+	0	0
9	♀ Neurasthenie	0.8	—	+	++	0	0

0 Nicht untersucht.

Es ist eine Tatsache, dass nach Anwendung einiger Medikamente unter Umständen eine negative Wa. R. positiv werden kann. Es wurde jedoch nicht näher untersucht, ob dies die Arzneiwirkung ist oder eine Veränderung des Blutserums selbst namentlich ist die Beziehung zwischen der Wa. R. und derMenge des Serumglobulins bisher wenig erklärt worden, was mit den Immunitätsreaktionen in Zusammenhang steht.

Es war daher notwendig in Tierexperimenten die Mischungsverhältnisse des Albumins und Globulins parallel mit der Wassermannschen Reaktion zu untersuchen. Kaninchenserum soll zuweilen positive Wa. R. zeigen. Nach M. H. Kuczyuski (1921) scheint die so häufig positive Wa. R. bei Kaninchen auf der bei diesen Tieren fast regelmässig vorhandenen Kokzidiose zu beruhen. Die Zunahme des positiven Grades der Reaktion nach

TABELLE V.

Adrenalininjektion und Wassermannsche Reaktion (bei Kaninchen).

Körpergewicht (g)	Adrenalindosis (ccm) (1%ige Lösung)	Zeit der Blutentnahme	Gesamteiweissgehalt des Serums (%)	Globulinanteil des Gesamteiweisses (%)	Absoluter Globulingehalt des Serums (%)		Angewandte Serumdosis (ccm) und Grad der Hämolysehemmung					
							0.2	0.1	0.08	0.06	0.04	0.02
2500	0.5	Vor der Injektion	8.71	30.0	2.6	Ohne Antigen	++	+	±	–	–	–
						Mit Antigen	++++	++++	+++	+++	++	+
		2 St. nach der Injektion	6.01	55.0	3.3	Ohne Antigen	++++	++++	+++	+++	++	+
						Mit Antigen	++++	++++	+++	+++	++	+
2550	0.7	Vor der Injektion	7.63	43.3	3.3	Ohne Antigen	++	....	....	....	....	....
						Mit Antigen	++	+	....	....	±	....
		1 St. nach der Injektion	7.86	47.0	3.7	Ohne Antigen	+++	....	....	....	....	....
						Mit Antigen	+++	++	...	....	+	....
		2 St. nach der Injektion	7.76	50.0	3.9	Ohne Antigen	++++	....	....	....	....	....
						Mit Antigen	++++	++++	....	....	++	....

Adrenalininjektion und Wassermannsche Reaktion (bei Meerschweinchen).

Körpergewicht (g)	Adrenalindosis (ccm) (1%ige Lösung)	Zeit der Blutentnahme	Gesamteiweissgehalt des Serums (%)	Globulinanteil des Gesamteiweisses (%)	Absoluter Globulingehalt des Serums (%)		Angewandte Serumdosis (ccm) und Grad der Hämolysehemmung			
							0.2	0.1	0.08	0.06
730	0.5	Vor der Injektion	7.48	30.8	2.3	Ohne Antigen	−	−	−	−
						Mit Antigen	−	−	−	−
		1 St. nach der Injektion	8.13	42.5	3.3	Ohne Antigen	++	+	−	−
						Mit Antigen	++	+	−	−
		2 St. nach der Injektion	6.22	50.0	3.12	Ohne Antigen	++	+	−	−
						Mit Antigen	++	+	−	−
300	0.3	Vor der Injektion	6.28	43.0	2.7	Ohne Antigen	±	−	−	−
						Mit Antigen	±	−	−	−
		2 St. nach der Injektion	5.51	49.0	2.7	Ohne Antigen	+	±	−	−
						Mit Antigen	+	±	−	−
285	0.3	Vor der Injektion	......	......	......	Ohne Antigen	−	−	−	−
						Mit Antigen	−	−	−	−
		1 St. nach der Injektion	......	......	......	Ohne Antigen	±	−	−	−
						Mit Antigen	±	−	−	−
		2 St. nach der Injektion	5.30	49.0	2.6	Ohne Antigen	++	±	±	−
						Mit Antigen	++	+	±	−
250	0.25	Vor der Injektion	6.98	30.0	2.1	Ohne Antigen	−	−	−	−
						Mit Antigen	−	−	−	−
		2 St. nach der Injektion	6.12	47.0	2.9	Ohne Antigen	++	+	+	−
						Mit Antigen	++	+	+	±

Pilokarpininjektion und Wassermannsche Reaktion (bei Meerschweinchen).

Körpergewicht (g)	Pilokarpindosis (ccm) (1%ige Lösung)	Zeit der Blutentnahme	Gesamteiweissgehalt des Serums (%)	Globulinanteil des Gesamteiweisses (%)	Absoluter Globulingehalt des Serums		Angewandte Serumdosis (ccm) und Grad der Hämolysehemmung			
							0.2	0.1	0.08	0.06
310	0.3	Vor der Injektion	6.80	30.0	2.0	Ohne Antigen	—	—	—	—
						Mit Antigen	—	—	—	—
		1 St. 20′ nach der Injektion(†)	6.61	30.6	2.0	Ohne Antigen	—	—	—	—
						Mit Antigen	—	—	—	—
300	0.3	Vor der Injektion	5.03	31.4	1.7	Ohne Antigen	—	—	—	—
						Mit Antigen	—	—	—	—
		2 St. nach der Injektion	5.27	53.0	2.8	Ohne Antigen	+	±	—	—
						Mit Antigen	+	±	—	—

Adrenalininjektion war bei Kaninchen in Hauptversuchsreihen kleiner, in Kontrollversuchen die ohne Antigen unternommene Hämolyse deutlicher gehemmt. Das Meerschweinchenserum zeigt fast immer keine positive Wa. R. Meine Experimente ergaben, dass bei Seren, die 1 bis 3 Stunden nach Adrenalininjektion (1 ccm von 1 promilliger Lösung pro Kilogramm) entnommen wurden, nicht nur die Wa. R. positiv ausfällt, sondern auch in Kontrollversuchen Hämolysehemmung auftritt, während die Seren vor der Injektion weder Wa. R. noch Hämolysenhemmung zeigten. Bemerkenswert ist es, dass das Adrenalinserum, welches pseudpositive Wa. R. und Hemmung der Hämolyse zeigte, grösseren Prozentgehalt von Globulin zeigte als das normale Meerschweinchenserum, wenn auch in der absoluten Menge des Globulins keine so deutliche Zunahme zu sehen war. Fast gleiche Verhältnisse sind auch bei Pilokarpininjektion zu konstatieren.

3. Hämolysehemmende Wirkung des Adrenalin- und Pilokarpinserums.

Versuche über die Hämolysehemmung des Adrenalin- und des Pilokarpinserums wurden aufs neue unternommen, indem das Serum in verschiedener Menge dem hämolytischen System beigemengt wurde.

TABELLE VI.

Tier	Körpergewicht (g)	Arznei u. Dosis	Zeit der Blutentnahme	Angewandte Serumdosis (ccm) und Grad der Hämolysehemmung							Eiweissgehalt des Serums (%)	Globulingehalt des Gesamteiweisses des Serums (%)	Globulingehalt (%)
				0.3	0.2	0.1	0.08	0.06	0.04	0.02			
Kaninchen	2250	1% Adrenalin 1.2 ccm	Vor d. Injekt.	+	+	±	−	−	−	−	5.55	45	2.5
			2 St. n. d. Injekt.	++++	++++	+++	++	+	−	−	6.51	66	4.3
Meerschweinchen	600	1% Adrenalin 0.6 ccm	Vor d. Injekt.	−	−	−	−	−	−	−	6.00	35	2.1
			1 St. n. d. Injekt.	++	+	±	−	−	−	−	5.40	50	2.7
			2 St. n. d. Injekt.	+++	+++	++	+	±	−	−	5.77	52	3.0
Meerschweinchen	650	1% Pilokarpin 0.5 ccm	Vor d. Injekt.	±	−	−	−	−	−	−	7.42	31	2.3
			1 St. n. d. Injekt.	++	++	+	−	−	−	−	5.38	54	2.9
			2 St. n. d. Injekt.	++	+	±	−	−	−	−	5.19	52	2.7

Auch hier nahm mit der Zunahme des Prozentsatzes des Globulins die antihämolytische Kraft zu, ebenso mit dem absoluten Globulingehalt. Bei Pilokarpinserum ist die gleiche Beziehung zu beobachten.

Es gibt mancherlei Substanzen, die im hämolytischen System die Hämolyse hemmen, z. B. hypertonische Salze, insbes. Chlorkalzium, ferner Pepton, Albumose, Traubenzucker, Lipoide u. s. w. Hyperglykämie nach Adrenalininjektion ist schon lange bekannt, doch erst eine Konzentration des Traubenzuckers über 0.5% ist im Stande, Verlangsamung der Hämolyse zu verursachen. Der Gehalt an Zucker im Blute kann nach Adrenalininjektion niemals in Tieren so gross werden, dass der Zusatz von nur kleiner Menge davon Verlangsamung oder sogar Hemmung der Hämolyse ausübt. Auch die Salzzunahme kann nicht die Ursache sein; denn es ist nicht denkbar, dass der Zusatz von nur 0.08-0.3 ccm Serum in 2.5 ccm hämolytischem System hypertonisch oder hämolysehemmend wirkt. Nach Inouye (1922) soll der Kalziumgehalt im Blute nach Adrenalininjektion nicht zugenommen sein. Pepton und Albumose alterieren das Serum in der Weise, dass in den Endresultaten Albuminzunahme herbeigeführt wird. Die Lipoide scheinen nach den Untersuchungen Y. Okadas (1920) zu Kioto bei Adrenalininjektion nicht deutlich zuzunehmen. Im Verlauf von Typhus wurde von Mozai (1921) zuweilen Globulinzunahme des Serums gefunden. In Anlehnung dazu habe ich in Typhussera Verhältnisse zwischen dem Globulingehalt und hämolysehemmende Wirkungen untersucht und fand antihämolytische Wirkungen der Sera desto mehr ausgeprägt, je grösser der Prozentgehalt des Serumglobulins ist.

Die hämolysehemmenden Wirkungen der Seren sind nach Friedemannscher Methode untersucht worden. Das hämolytische System, dessen Hämolyse durch Zusatz von Seren gehemmt ist, wird zentrifugiert, überstehende Flüssigkeit abpipettiert und die sedimentierten roten Blutkörperchen unter Zusatz des neuen Komplements im Thermostat 1 Stunde stehen gelassen, wobei totale Hämolyse stattfindet. Die Blutkörperchen haben selbst bei Anwesenheit hämolysehemmenden Serums das Hämolysin adsorbiert, wirken somit antikomplementär.

TABELLE VII.

Hämolysehemmende Wirkung der Typhuskrankensera und Globulingehalt.

Patient	Krankheitstag	Fieber	Viskosität der Sera	Refraktion der Sera (Skalenteil)	Gesamteiweissgehalt des Serums (%)	Globulinteil des Gesamteiweisses (%)	Absoluter Globulingehalt (%)	Serumdosis (ccm) u. Grad der Hämolysehemmung					
								0.3	0.2	0.1	0.08	0.06	0.04
M ? 14 j. ♂	ca. 14	39°.5–40°	1.65	48.8	5.85	64.0	3.7	+++	+++	++	+	+	±
I. N. 32 j. ♀	42	36°	1.73	52.0	6.53	58.0	3.8	++++	+++	++	++	+	±
K. O. 22 j. ♂	11	38°–39	1.64	50.1	6.12	54.0	3.3	+++	++	+	±	±	–
T. I. 28 j. ♀	42	37°–36°.5	1.65	53.0	6.75	39.0	2.6	++	++	±	–	–	–
K. M. 19 j. ♀	39	36°–37°	1.84	56.5	7.52	40.0	3.0	++	++	+	±	–	–
M ? ♀	?	40°	1.84	55.0	7.20	60.0	4.3	+++	+++	++	+	+	±

4. Einfluss von Adrenalinserum auf die Agglutination.

Bei Immunseris findet man recht häufig eine Änderung der Agglutinationsbreite, die sich dadurch kundgibt, dass höhere Konzentrationen des Serums (1 : 10 bis 1 : 50) nur schwache oder gar keine Agglutination zeigen, während stärkere Verdünnungen (1 : 100 und darüber) kräftig agglutinieren. Werden in diesem Fall keine Verdünnungen angelegt, so kann die Erscheinung zu einer wichtigen Fehlerquelle werden. Die Erklärung dieser Erscheinung wurde in Anlehnung an die Ehrlichsche Toxoidlehre in der Anwesenheit von Agglutinoiden gesucht, deren Bindung an die agglutinable Substanz die Wirkung des Agglutinins verhindert. Dazu kommt auch, dass bei der Verdünnung des Serums infolge Verminderung der hemmenden Substanz (des Agglutinoids) bei genügender Anwesenheit von Agglutinin und agglutinabler Substanz wieder Agglutination auftritt. Die Breite der Hemmungszone eines Serums hängt ausser von dem Agglutinoid auch von der Dichte der Bakterienaufschwemmung ab, ausserdem entstehen Hemmungszonen auch durch Wärme, verschiedene Salze, Säuren, Alkali, Formol u. s. w.

A. Adrenalininjektion zu aktiv immunisierten Kaninchen.

Experimente von Sakaguchi, Hayashi und Tanabe, (1918) und Mozai (1922) ergaben, dass Zunahme des Globulinanteils des Serumeiweisses in gewisser Zeit des Immunisierungsverlaufes vorkommt. Um bedeutendere Zunahme des Globulins zu erzielen, wurde ein Kaninchen mit Typhusbazillen, dann 10 Tage nach der letzten Injektion mit grosser Dose Adrenalin behandelt. 2 und 5 Stunden nach der Adrenalininjektion wurde Blutserum entnommen, und einerseits Hemmung der Agglutination und anderseits Eiweissverteilung im Serum geprüft.

Der Prozentsatz des Gesamteiweisses des Serums war nach der Adrenalininjektion eher abgenommen, dagegen der relative Prozentgehalt an Globulin beträchtlich zugenommen, Hemmungszone der Agglutination später deutlich breiter als vorher.

Kaninchen von 2200 g wurde am 3. Mai mit 4 Ösen, am 7. mit 8 Ösen von abgetöteten Typhusbazillen intravenös injiziert; am 17. Mai nüchtern 2 ccm Blut entnommen und sofort Adrenalin (1 ccm von 1‰ Lösung) subkutan injiziert. Das Tier starb 5 Stunden nach der Adrenalininjektion während der Blutentnahme. Bei der Sektion wurden ausgedehnte Blutungen und Ödem der beiden Lungen gefunden. Resultate der Agglutination siehe Tabelle 8.

TABELLE VIII.

Zeit der Blutentnahme	Viskosität des Serums	Skalenteil der Refraktion	Gesamteiweissgehalt des Serums (%)	Globulinteil des Gesamteiweisses (%)	Absoluter Globulingehalt des Serums (%)	Serumverdünnungen u. Deutlichkeitsgrad der Agglutinationserscheinung								
						1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1000
Vor d. Adrenalininjekt.	1.87	55.2	7.24	63.0	4.6	—	—	±	±	++	+++	+++	++	±
2 St. n. Injekt.	1.76	51.7	6.53	67.0	4.4	—	—	—	±	+	++	+++	++	±
5 St. n. Injekt.	1.74	50.6	6.13	72.0	4.4	—	—	—	±	+	++	+++	++	±

B. Adrenalininjektion bei passiv immunisierten Kaninchen.

3 Kaninchen wurden mit Antityphoidpferdeserum passiv immunisiert, welches keine deutliche Agglutinationshemmung zeigte, während ihnen je 5 ccm vom Immunserum intravenös injiziert wurden. Bei 2 der Tiere sofort 1 ccm Adrenalin (1‰ Lösung) pro kilo subkutan injiziert. 15′ und auch 3 Stunden nachher wurde das Blut entnommen, und Eiweissverteilung und Agglutinationshemmung untersucht. Alle Sera zeigten ganz gleiche Agglutinationstiter. Bei einem der passiv immunisierten, dann adrenalininjizierten Tiere zeigte sich ausserordentlich breite Hemmungszone in höherer Konzentration und ebenso starke Zunahme von Globulingehalt. Diese Hemmung verschwand beim Erwärmen in 56°C nicht. Bei Seren des nicht adrenalininjizierten Tieres war die Hemmungszone nicht deutlich.

TABELLE IX.

Körpergewicht des Kaninchens (g)	Dosis des Immunserums (intravenös) (ccm)	Adrenalindosis (1‰) (subkutan) (ccm)	Zeit der Blutentnahme (nach Adrenalininjektion)	Gesamteiweissgehalt des Serums (%)	Globulinteil des Gesamteiweisses (%)	Abs. Globulingehalt des Serums (%)	Verdünnung der Sera und Deutlichkeitsgrad der Agglutinationserscheinung									
							$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$
1500	5.0	1.5	15′	6.20	36.0	2.2	+	++	+++	++++	++++	++++	+++	++	±	—
			3 St.	6.82	60.0	4.1	—	—	—	—	±	++	++	+	—	—
1560	5.0	1.5	15′	6.00	28.0	1.7	++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	±	—
			3 St.	6.28	31.0	2.0	++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	±	—
1450	5.0		15′	6.90	32.0	2.2	+	++	+++	++++	++++	++++	+++	++	+	—
			3 St.	6.48	34.0	2.2	+	++	+++	++++	++++	++++	+++	++	+	—

C. Versuche in vitro über die Beziehungen des agglutinierenden Systems zum hemmenden Serum, im speziellen des Globulingehaltes. I.

Eine Reihe von Reagenzröhrchen wurde mit bestimmter Menge Agglutinin gefüllt, in jedes Röhrchen stufenweise absteigende Dose hemmenden Serums und 1 Öse von Typhusbazillen hinzugefügt, 2 Stunden im Brütofen stehen gelassen.

Nr. 1. Zum agglutinierenden System wurde 0.1 ccm von einem Kaninchenserum, dessen Gesamteiweissgehalt 7.8%, Globulinanteil 50% des Gesamteiweisses war, hinzugefügt, es erschien aber ganz undeutliche oder kaum sichtbare Agglutination. Wenn über 0.2 ccm hinzugefügt wurde, erschien gar keine sichtbare Agglutination.

Nr. 2. 0.5 ccm von anderem Kaninchenserum, dessen Gesamteiweiss 7.33%, Globulinanteil desselben 30% und Albuminteil

70% war, hinzugefügt; es erschien deutliche Agglutination.

Nr. 3. Mehr als 0.2 ccm von einem Meerschweinchenserum, dessen Globulin 2.6%, Globulinteil des Gesamteiweisses 49% war, hinzugefügt: deutliche Hemmung.

Nr. 4. Meerschweinchenserum, Globulin 2.1%, Globulinteil 30%, Albuminteil 70%: Resultat wie Nr. 2.

TABELLE X.

Hemmende Sera Nr.	Gesamteiweissgehalt d. Serums (%)	Globulinteil d. Gesamteiweisses (%)	Absol. Globulingehalt (%)	Hinzugefügte Dosis der hemmenden Sera und Deutlichkeitsgrad der Agglutinationserscheinung									
				0.5	0.3	0.2	0.1	0.08	0.06	0.04	0.02	0.01	Kontrolle
1	7.80	50.0	3.9	−	−	±	+	++	+++	++++	++++	++++	++++
2	7.33	30.0	2.2	+	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	5.30	49.0	2.6	−	−	±	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
4	7.00	30.0	2.1	+	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Als Agglutinin 1 ccm $\frac{1}{100}$ verdünntes Immunpferdeserum, dessen Agglutinintiter 1:10000 ist, angewandt.

Typhusbazillen: 1 Normalöse.

Bei der Hemmung der Agglutination ist nicht das Gesamteiweiss selbst, sondern das Mischungsverhältnis von Globulin und Albumin im Serum, besonders der Prozentgehalt des Globulins wichtig.

Versuch in vitro II.

Zu einer konstanten Menge hemmenden Serums und einer konstanten Menge von Bakterien wurde aufsteigende Dosis Agglutinin hinzugefügt; in jeder Einheit Agglutinin 0.3 ccm von Serum Nr. 1. zeigte sich immer deutliche Hemmung der Agglutination, während 0.05 ccm die Agglutination nicht gehemmt hatte. Also fand ich, dass solche Hemmungserscheinung zur Menge des Agglutinins in keiner Beziehung steht.

TABELLE XI.

Dosis des hemmenden Serums	Verdünnungen des Immunserums und Deutlichkeitsgrad der Agglutinationserscheinung													
	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{4000}$	$\frac{1}{8000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{20000}$
0.3	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	–
0.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
0.05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
—	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	–

Als hemmendes Serum das Serum Nr. I angewandt.

Versuch in vitro III.

Ein agglutinierendes System, welches durch Hinzufügen von hemmendem Serum keine deutliche Agglutination zeigte, wurde nunmehr zentrifugiert, überstehende Flüssigkeit abpipettiert, sedimentierte Bakterien in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und im Brütofen 2 Stunden stehen gelassen. Ein Teil der Bakterien wurde unvollkommen agglutiniert; setzt man noch weiter zu dieser Suspension Magnesiumsulfat, Kobaltchlorat, Bariumnitrat, Kobaltkomplexe u. s. w. in doppelter Dosis des Schwellenwerts und wird nun das ganze im Brütofen 2 Stunden lang stehen gelassen, dann tritt deutliche, doch nicht vollkommene Agglutination auf. Also ist es wahrscheinlich, dass ein Teil des Agglutinins sich mit den Bakterien verbunden hatte, obwohl ihre Verbindung mangelhaft war, so dass die sensibilisierten Bakterien durch die Gegenwart grosser Menge Globulins nicht im Stande waren auszuflocken. Aber da die Bindung der Bakterien mit Agglutinin mangelhaft war, so ist es denkbar, dass das Serum auch vielleicht antireaktiv wirkt.

5. Zusammenfassung des III. Teils.

1) Nach Adrenalin- oder Pilokarpininjektion tritt im Serum

nicht syphilitischer Personen eine Reaktion auf, die der Wassermann schen ähnlich ist.

2) Dies beruht auf Zunahme des Globulinanteils im Blutserumeiweiss.

3) Die Untersuchung des Blutes auf Wa. R. darf nicht nach Gebrauch von gewissen Medikamenten vorgenommen werden.

4) Die Hemmung der Agglutination steht in inniger Beziehung zum Mischungsverhältnisse des Globulins und des Albumins im Serum, insofern als die Vermehrung des Globulins die Fällung des Agglutininbakteriengemisches beeinträchtigt und auch etwas antireaktiv wirkt.

Herrn Prof. K. Miura, Herrn Prof. S. Mita, und Herrn Prof. Y. Shibata, denen ich die Anregung und Unterstützung zu dieser Arbeit verdanke, spreche ich meinen verbindlichsten Dank aus.

LITERATUR.

Altobelli und Memmo, (1902): C. f. Bakt., **31**, 221.
Bauer, (1922): Wien. kl. W., Nr. 8. 173.
Bechhold, (1904): Z. f. physik. Chem., **48**, 385.
Bordet, (1899): L'Ann. de Pasteur, **13**, 225.
Bordet et Gay, (1908): L'Ann. de Pasteur, **22**, 625.
Bredig, (1901): Anorganische Fermente, Leipzig.
Bruck, Röminger und v. Dungern, Much u. Emden, cit. Bauer, (1922): Wien. kl. W., Nr. 8.
Burton, (1905): Philos. Mag., **6**, 472.
Buxton und Teague, (1906): Z. f. phys. Chem., **57**, 64.
Ehrlich u. Morgenroth, (1900): Berl. kl. W., **31**, 681.
Ehrlich u. Morgenroth, (1901): Berl. kl. W., **10**, 251, **22**, 569.
Freundlich, (1910): Z. f. physik. Chem., **73**, 385.
Friedberger, (1901): C. f. Bakt., **30**, 336.
Friedberger, (1902): C. f. Bakt., **31**, 109.
Friedemann: Arch. f. Hyg., **60**.
Friedemann: Z. f. Hyg., **67**.
Hardy, (1899): Journ. of Physiol., **24**.
Hirschfeld u. Klinger, (1914): Berl. kl. W., **25**, 1173.
Inouye, (1922): Mitteil. d. med. Gesellsch. zu Tokio, (Japan) Nr. 6.
Joos, (1901): Z. f. Hyg., **36**, 422.
Joos, (1902): Z. f. Hyg., **40**, 203.

Kuczyuski, (1921): Berl. kl. W., **6**, 125.
Marschall u. Morgenroth, (1902): Z. f. kl. Med., **47**, 279.
Matsuno, (1918): J. of Tokio Chem. Soc., (Japan), Nr. 10.
Mozai, (1921): Mitteil. d. med. Gesells. zu Tokio., (Japan) **38**, 662.
Mozai, (1921–1922): Nippon Naikwagakkwai-Zasshi (Japan).
Müller, (1901): C. f. Bakt., **29**, 175.
Müller, (1901): C. f. Bakt., **29**, 860.
Neisser u. Friedemann, (1904): Münch. m. W., **11**, 465, **19**, 827.
Neisser u. Doering, (1901): Berl. kl. W., **22**, 593.
Okada, (1920): Nippon Naikwagakkwai-Zasshi, (Japan) Nr. 5.
Picton & Linder, (1897): Journ. of Chem. Soc., **71**.
Porges, (1905): C. f. Bakt., **40**, 133.
Rona u. Gyorgy, (1920): Bioch. Zeitschr., **105**, 120.
Rohrer, (1917): Arch. f. kl. Med., **121**, 221.
Sakaguchi, Hayashi und Tanabe, (1918): Mitteil. d. med. Fak. d. Kaiserl. Universität zu Tokio, **20**, 427.
Wetham: Phil. Mag., **48**.

ÜBER DEN EINFLUSS DER EIWEISS-FETTDIÄT AUF DEN KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL.

V. Mitteilung.

VON

NAOMI KAGEURA.

(*Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. Ryōkichi Inada, Kaiserliche Universität zu Tokyo.*)

(Eingegangen am 29. November 1923.)

In meiner letzten Arbeit habe ich soweit sichergestellt, dass die Glykogenaufstapelung in der Leber bei einem mit Eiweiss-Fett gefütterten Hunde auffallend geringfügiger vonstatten geht, als bei einem kohlehydratreich genährten Tiere, wenn man die überlebende Leber mit dem defibrinierten Blute desselben Tieres durchblutet. Weil hier die Frage noch offen bleibt, ob diese mangelhafte Glykogenbildung auf einer direkten Schädigung der Leberfunktion selbst beruht oder die Erscheinung daher kommt, dass irgendeine die Glykogenbildung hemmende resp. das Glykogen mobilisierende Substanz bei Eiweiss-Fettdiät im Blute zirkuliert, so habe ich mich auf Anraten und unter der Leitung von Proff. R. Inada und K. Sakaguchi bemüht, diese Frage durch folgende Untersuchung zu entscheiden.

Meine Untersuchungen wurden an zwei Reihen Tieren in ganz umgekehrter Versuchsanordnung ausgeführt, indem einerseits die Leber eines kohlehydratreich genährten Hundes mit dem Blute eines kohlehydratarm gefütterten Tieres und anderseits die Leber eines kohlehydratarm genährten Tieres mit dem Blute eines kohlehydratreich gefütterten durchblutet wurde. Was das Verfahren des Durchblutungsversuches im einzelnen anbetrifft, so geschah es ganz ähnlich wie in der Mitteilung IV. Die Leber wurde also nach der Entblutung des Tieres möglichst schnell herausgenommen, dann ein Läppchen davon zur Bestimmung des präformierten Glykogengehaltes gebraucht und der übrige Hauptanteil mit dem traubenzuckerhaltigen defibrinierten Blute eine Stunde lang durchströmt. Endlich wurde der Glykogengehalt des durchbluteten Leberanteils bestimmt. In der Tabelle I sind die Resultate meiner Untersuchungen angegeben, bei welchen die Leber des kohlehydratreich genährten Hundes mit dem Blute des kohlehydratarm gefütterten durchblutet wurde.

TABELLE I.

Nr. d. Hundes		Gewicht d. durchbluteten Leberanteils	Glykogengehalt der Leber		Zunahme des Glykogengehaltes	
					absolut	relativ
		g	%	g	g	%
13	Vor d. Durchb.	711	0.67	4.76	5.22	**110**
	Nach „ „	1280	0.78 (1.41)	9.98		
14	Vor „ „	313	0.72	2.25	2.91	**129**
	Nach „ „	607	0.85 (1.65)	5.16		
15	Vor „ „	491	0.55	2.70	4.19	**155**
	Nach „ „	810	0.85 (1.41)	6.89		
16	Vor „ „	497	0.52	2.58	3.76	**146**
	Nach „ „	880	0.72 (1.28)	6.34		
17	Vor „ „	479	0.49	2.35	3.32	**141**
	Nach „ „	900	0.63 (1.19)	5.67		

Tabelle II betrifft die Untersuchungen, bei welchen die Leber des mit Eiweiss-Fettdiät gefütterten Hundes mit dem Blute des kohlehydratreich genährten durchströmt wurde.

TABELLE II.

Nr. d. Hundes		Gewicht d. durchbluteten Leberanteils	Glykogengehalt der Leber		Zunahme des Glykogengehaltes absolut	Zunahme des Glykogengehaltes relativ
		g	%	g	g	%
18	Vor d. Durchb.	585	0.38	2.22	1.80	82
	Nach „ „	1060	0.38 (0.69)	4.02		
19	Vor „ „	345	0.59	2.04	1.04	51
	Nach „ „	570	0.54 (0.89)	3.08		
20	Vor „ „	340	0.85	2.89	2.04	71
	Nach „ „	685	0.72 (1.45)	4.93		
21	Vor „ „	442	0.85	3.76	1.43	38
	Nach „ „	775	0.67 (1.19)	5.19		
22	Vor „ „	291	0.69	2.01	0.85	42
	Nach „ „	520	0.55 (0.82)	2.86		

Die Zunahme des Glykogengehaltes der durchbluteten Leber ist in der Tabelle III übersichtlich zusammengestellt, indem die Kolonne I und IV aus der Mitteilung IV (1924) und die Kolonne II und III aus der Tabelle I resp. II hier zitiert wurden.

TABELLE III.

Ernährungsweise des Hundes, aus welchem die Leber resp. das Blut genommen wurden.

Leber	Kohlenhydratreich				Kohlenhydratarm			
Blut	K. H.-reich		K. H.-arm		K. H.-reich		K. H.-arm	
	Hunde-Nr.	Relative Glykogenzunahme	Hunde-Nr.	Glykogenzunahme	Hunde-Nr.	Glykogenzunahme	Hunde-Nr.	Glykogenzunahme
		%		%		%		%
	1	122	13	110	18	82	7	17
	2	97	14	129	19	51	8	68

	Ernährungsweise des Hundes, aus welchem die Leber resp. das Blut genommen wurden.							
Leber	Kohlenhydratreich				Kohlenhydratarm			
Blut	K. H.-reich		K. H.-arm		K. H.-reich		K. H.-arm	
	Hunde-No.	Relative Glykogenzunahme	Hunde-Nr.	Glykogenzunahme	Hunde-Nr.	Glykogenzunahme	Hunde-Nr.	Glykogenzunahme
		%		%		%		%
	3	133	15	155	20	71	9	60
	4	192	16	146	21	38	10	23
	5	110	17	141	22	42	11	26
	6	116					12	61
Mittel		128		136		57		43
Nr. d. Kolonne	I		II		III		IV	

Aus der Tabelle kann man leicht ersehen, dass die Glykogenaufstapelung im allgemeinen bei der Leber aus einem kohlehydratreich genährten Hunde sehr stark und bei der aus einem kohlehydratarm gefütterten Tiere nur in geringem Masse in die Erscheinung trat, während die Ernährungsweise des Hundes, aus welchem das zur Durchblutung gebrauchte Blut entnommen wurde, auf den Glykogengehalt der durchbluteten Leber keinen nennensweten Einfluss ausübte. Aus diesem Befunde kann man schliessen, dass die mangelhafte Glykogenbildung in der Leber bei der Eiweiss-Fettdiät wesentlich auf der herabgesetzten Leberfunktion selbst beruht und die veränderte Beschaffenheit des Blutes dafür nicht die Hauptrolle spielt.

LITERATUR.

Kageura, Naomi (1924): IV. Mitteilung. Journ. Biochem. **3**, 205.

THE EFFECT OF THE SALT SOLUTION ON THE RED CORPUSCLES IN BLOOD.

By

JUNICHI UMEZAWA.

(*From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tokyo Imperial University. Director: Prof. S. Kakiuchi.*)

(Received for publication, August 18, 1923.)

In the previous communication (Umezawa, 1923) the author reported that the electroendosmose through porous membrane ceases when there is a certain amount of salt present either on both side of the membrane or on one of them. As, however, the membrane used in those experiments was an artificial one made of collodium, the author wanted to verify the fact by using the natural membrane.

It has been long known, that the red blood corpuscles maintain their normal volume in liquids which have the same osmotic pressure as the blood. In the solution of osmotic pressure lower than that of the blood they swell, and if the difference is tolerably large hemolysis will finally occur, while in solutions possessing a higher osmotic pressure they contract accordingly. Since they are extremely sensitive to such an influence, their volume will alter by a trifling change in the osmotic pressure of the surrounding solution. Taking advantage of this property, we can use the volume of red blood corpuscle to test the movement of water through its membrane.

The corpuscle used in this investigation was prepared from defibrinated horse blood by washing the latter four times with physiological (0.9%) NaCl solution by means of a centrifuge.

I. THE CHANGE OF FORM OF RED CORPUSCLES IN SALT SOLUTIONS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS.

To each 10 cc. of $K_4Fe(CN)_6$ or NaCl solution of different concentrations (M/4096, M/2048, M/1024......M/32, M/16, M/8, M/4) in a number of test tubes one drop of the emulsion of the red blood corpuscles was added and left for the experiments at room temperature. In the case of $K_4Fe(CN)_6$ hemolysis occurred rapidly in the concentrations below M/32 while in the concentrations over M/16 no hemolysis took place. The corpuscle in the concentration of M/16 showed normal form under the microscope, while the corpuscle shrank slightly in the concentration of M/8. The shrinking of corpuscle was seen distinctly in the concentration of M/4. In the case of NaCl solution (instead of $K_4Fe(CN)_6$) hemolysis occurred promptly in the concentration below M/16, but in the concentration over M/8 no hemolysis was observable. The corpuscle in the concentration of M/8 showed normal form under the microscope, and in the concentration of M/4 a little shrinking. The shrinking of corpuscle occurred more strongly with increasing concentration.

TABLE I.

Corpuscle in different concentration of $K_4Fe(CN)_6$ solution.

M/4096	M/2048	M/1024	M/512	M/256	M/128	M/64	M/32	M/16	M/8	M/4
hemolysis	hemolysis	hemolysis	hemolysis	hemolysis	hemolysis	hemolysis	hemolysis	form normal	contraction trifling	contraction stronger

TABLE II.

Corpuscle in different concentration of NaCl solution.

M/4096	M/2048	M/1024	M/512	M/256	M/128	M/64
hemolysis	hemolysis	hemolysis	hemolysis	hemolysis	hemolysis	hemolysis

M/32	M/16	M/8	M/4	M/2	1M	2M
hemolysis	hemolysis	form normal	contraction trifling	contraction trifling	contraction stronger	contraction stronger

When, however, we used the M/8 NaCl solution as the medium of solution of $K_4Fe(CN)_6$, we could prevent the corpuscles from the hemolysis caused by hypotonicity of the medium of suspension. For this purpose we could use also a saccharose solution, which has the same osmotic pressure as the M/8 NaCl solution (by kryoscopy).

We found in the experiment by collodion membrane the distinction between an electrolyte and non-electrolyte upon the rate of diffusion of water through these membranes caused by different distribution of certain kinds of salt as Figs. 1 and 2 show. In the following experiments the writer repeated the same experiments with red blood corpuscle instead of collodion membrane.

1. Solvent containing electrolyte.

The differently concentrated solutions of $K_4Fe(CN)_6$ were made with M/8 NaCl solution. 10 cc. of each mixture was put into a test tube and one drop of the emulsion of corpuscles was added to each test tube. In this case no hemolysis occurred and by the influence of $K_4Fe(CN)_6$ the corpuscles showed the contraction over a certain concentration of $K_4Fe(CN)_6$. About one hour after commencement of the experiment the corpuscle showed namely under the microscope a normal form when the concentration of

$K_4Fe(CN)_6$ was below M/256 while over this concentration we could perceive the shrinkage, which became stronger gradually with the increasing concentration of $K_4Fe(CN)_6$. The concentration, at which the corpuscle begins to shrink, is somewhat different ni each experiment. However, in all the experiments the shrinking of corpuscles was stronger with the increasing concentration of $K_4Fe(CN)_6$ and we found no concentration in which the concentration was weaker than that in next lower concentration.

2. Solvent containing non-electrolyte.

The corpuscle, used in this experiment, was washed four times with isotonic saccharose solution instead of physiological NaCl solution.

The different concentration of $K_4Fe(CN)_6$ were made up in saccharose solution, which is isotonic with the M/8 NaCl solution. In such solutions the corpuscles showed special behaviour in which they shrank in the concentration of about M/512 or M/256 and this configuration became weaker with increasing concentration of $K_4Fe(CN)_6$, until finally it disappeared in concentration of about M/64 $K_4Fe(CN)_6$. In higher concentrations than this the corpuscle showed again a little shrinking which was strengthened with the increasing concentration.

The same result was observed in the experiment with NaCl instead of $K_4Fe(CN)_6$; namely with the mixture of isotonic saccharose and NaCl solutions. In this case the corpuscle showed nearly normal form in M/16 or M/8 NaCl.

II. THE DETERMINATION OF THE VOLUME OF CORPUSCLE.

The effect of salt solution on the electroendosmose through blood cell membrane was then studied by means of the change of volume of corpuscles.

For this purpose a centrifuge glass tube of 13 cc. graduated in 0.1 cc. scale was used.

1. Solvent containing electrolyte.

1 cc. of well washed erythrocytes was added to each 10 cc. of $K_4Fe(CN)_6$ solution of different concentration containing M/8 NaCl and centrifugalised for 10 minutes. The volume occupied by the corpuscles in each tube was then compared. As the following table shows, the volume of corpuscles was normal in M/256 $K_4Fe(CN)_6$, while it decreased with increasing concentration of $K_4Fe(CN)_6$ solution.

TABLE III.

No. of experiment		Concentration of $K_4Fe(CN)_6$				
		0	M/1024	M/256	M/64	M/16
1	Volume	1.10	1.10	1.10	1.02	0.90
	Form	Normal	Normal	Normal	Contraction	Contraction increased
2	Volume	1.30	1.30	1.28	1.10	0.90
	Form	Normal	Normal	Normal	Contraction	Contraction increased
3	Volume	1.08	1.08	1.05	1.02	0.90
	Form	Normal	Normal	about normal	Contraction	Contraction increased

2. Solvent containing non-electrolyte.

The different concentrations of $K_4Fe(CN)_6$ were made up in isoosmotic saccharose solution and the test as mentioned above was repeated. In this case the corpuscle was washed previously with isotonic saccharose solution. The results are indicated in the following table.

TABLE IV.

	Control	Concentration of $K_4Fe(CN)_6$			
	isoosmotic cane suger	M/1024	M/256	M/64	M/16
Volume	1.12	1.12	1.19	1.06	0.90
Form	Normal	Normal	Distinct contraction	about normal	Distinct contraction
Volume	1.30	1.30	1.30	1.20	0.98
Form	Normal	Normal	Distinct contraction	about normal	Distinct contraction
Volume	0.78	0.78	0.90	0.80	0.67
Form	Normal	Normal	Distinct contraction	about normal	Distinct contraction
Volume	0.82	0.82	0.82	0.77	0.68
Form	Normal	Normal	Distinct contraction	about normal	Distinct contraction

As the table IV shows, the volume of corpuscle increased against our expectation at the concentration of M/256. The volume should be reduced if the water come out of the corpuscles. This paradoxical fact might be explaind by assuming that the corpuscles which took the prickle-shape in this concentration could not be compressed so tightly by centrifugation.

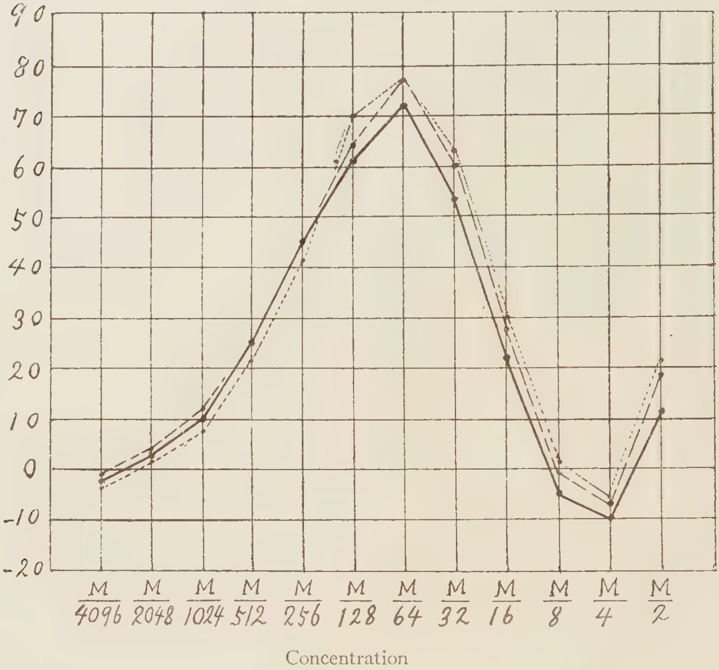
III. Conclusion.

From the above mentioned experiments the author is inclined to deduce the conclusion that in the dilute solution of salts, as $K_4Fe(CN)_6$ and NaCl, the blood corpuscles shrink owing to the electroendosmical phenomenon. In the presence of other electrolyte in sufficient amount in the solution, however, this shrinkage disappears, while the non-electrolyte has no such an action. This can not be proved by examining the volume of blood corpuscles centrifuged, as the latter in shrank form is difficult to be brought together tightly enough by means of a centrifuge.

REFERNACES.

Loeb, J. (1918–19): Gen. Physiol., **1**, 717.
Loeb, J. (1919–20): Gen. Physiol., **2**, 87.
Loeb, J. (1919–20): Gen. Physiol., **3**, 173.
Umezawa, J. (1923): J. of Biochem., **2**, 523.

Fig. 1.

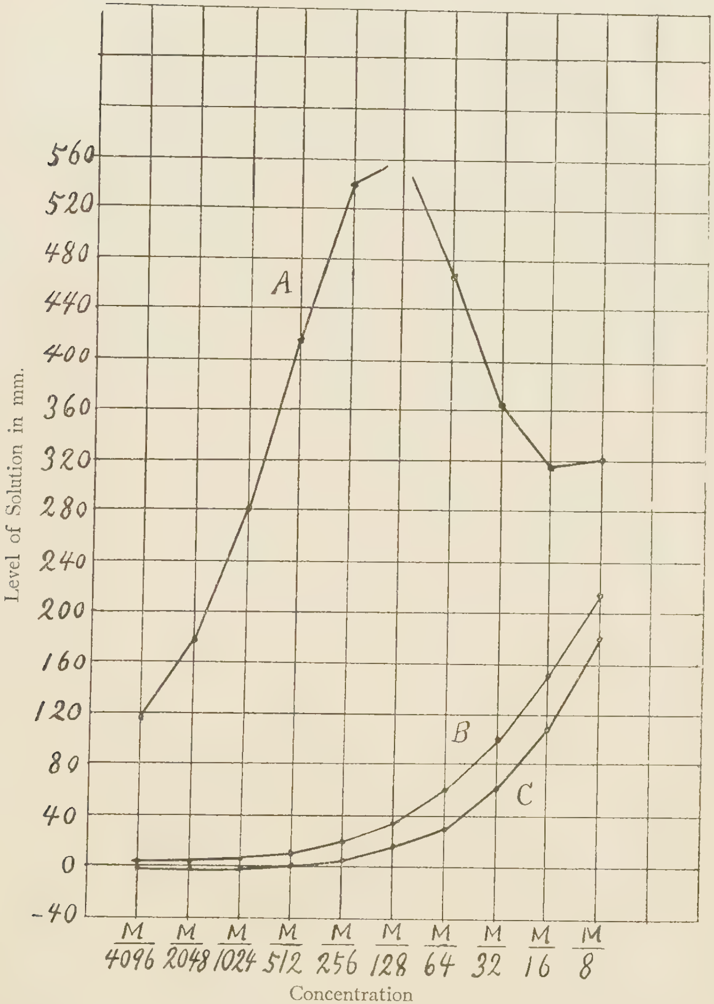


———— NaCl alone

- - - - - - - NaCl + M/8 Glycerol on both sides of the membrane

NaCl + M/8 Alcohol on both sides of the membrane

Fig. 2.



A {inside: $K_4Fe(CN)_6$ + Cane Sugar isoosmotic with M/8 NaCl
outside: distilled water

B {inside: $K_4Fe(CN)_6$ + M/8 NaCl
outeside: distilled water

C {inside: $K_4Fe(CN)_6$ + M/8 NaCl
outside: M/8 NaCl

INDEX TO VOLUME III.

ABSORPTION, On the nature of the —— of ammonia by soils. 283.

Acidity, On the nature of the —— appearing after the addition of soy-bean cake to a rice field. 305.

Agglutinationsphänomen, Über den Einfluss des Salzes und des Globulins auf das ——. 423.

Albumin, The effect of the presence of —— on the physico-chemical properties of lecithin. 393.

Aminoethyl alcohol, Compounds of —— with saturated and unsaturated fatty acids. 15.

Ammonia, On the nature of the absorption of —— by soils. 283.

Amylase, Über die Spaltung der Stärke durch ——. I. 149.

BLOOD, Studies on some factors in the coagulation of ——. 91.

——, The effect of the salt solution on the red corpuscles in ——. 461.

Blood serum, On the dispersity and the surface tension of ——. 195.

Blut, Über die glykolytische Kraft des ——es. II. Mitteilung. 273.

CALCIUM carbonate, On the effect of calcium oxide and —— upon the decomposition of soy-bean cake and herring cake in two different soils. 27.

Calcium oxide, On the effect of —— and calcium carbonate upon the decomposition of soy-bean cake and herring cake in two different soils. 27.

Carbohydrates, Chemical studies of corn pollen. II. —— and organic bases. 169.

Catalytic activity, Studies on —— and oxidative activity. 211.

Cephalin, On the fatty acids obtained from ——. 15.

Coagulation of blood, Studies on some factors in the ——. 91.

Copper, On the germicidal action of hydrosol of ——. 1.

Corn pollen, Chemical studies of ——. 169.

DISPERSITY, On the —— and the surface tension of blood serum. 195.

EIWEISSFETTDIÄT, Über den Einfluss der —— auf den Kohlenhydratstoffwechsel. IV. Mitteilung. 205.

V. Mitteilung. 457.

Eto, Itsuo. Beiträge zur Kenntnis des Gliadins. 373.

FATTY acids, On —— obtained from cephalin. 15.

Fujii, Nobuzo. Studies on physico-chemical properties of phospholipin. II. The effect of the presence of albumin on the physico-chemical properties of lecithin. 393.

GERMICIDAL action, On the —— of hydrosol of copper. 1.

Gliadin, Beiträge zur Kenntnis des ——s. 373.

Globulin, Über den Einfluss des Salzes und des ——s auf das Agglutinationsphänomen. 423.

Glykolytische Kraft, Über die —— des Blutes. II. Mitteilung. 273.

HARADA, Ken. Über die Spaltung der Stärke durch Amylase. I. 149.

Herring cake, On the effect of calcium oxide and calcium carbonate upon the decomposition of soy-bean cake and —— in two different soils. 27.

ISHIMASA, Motaro and KOMATSU, Shigeru. On the biochemical study of the ripening of the kaki-fruit. V. 261.

ITO, Mitsuji and MIYAKE, Koji. On lethal temperature of pure koji-diastase in aqueous solution and recovery of its action after heating. 177.

IWANO, Masao. Some analytical studies on the urinary calculus. 67.

KAGEURA, Naomi. Über den Einfluss der Eiweissfettdiät auf den Kohlehydratstoffwechsel. IV. Mitteilung. 205.
V. Mitteilung. 457.

Kaki-fruit, On the biochemical study of the ripening of the ——. V. 261.

KAWASHIMA, Yoshikane. Über die glykolytische Kraft des Blutes. II. Mitteilung. 273.

KIKUCHI, Shinjiro. Effect of various substances on the vitality of red blood corpuscles. 325.

KIMURA, Taizo. Studies on catalytic and oxidative activity. 211.

KOGANEI, Ryoichi. On fatty acids obtained from cephalin. Compunds of β-amino-ethyl alcohol with saturated and unsaturated fatty acids. 15.

Kohlenhydratstoffwechsel, Über den Einfluss der Eiweissfettdiät auf den ——. IV. Mitteilung. 205.
V. Mitteilung. 457.

Koji-diastase, On lethal temperature of pure —— in aqueous solution and recovery of its action after heating. 177.

KOMATSU, Shigeru and ISHIMASA, Motaro. On the biochemical study of the ripening of the kaki-fruit. V. 261.

KUSUNOKI, Michio. On the germicidal action of hydrosol of copper. 1.

KUWASHIMA, Kaname. Studies on some factors in the coagulation of blood. 91.

LECITHIN, The effect of the presence of albumin on the physico-chemical properties of ——. 393.

Lethal temperature of pure koji-diastase in aqueous solution and recovery of its action after heating. 177.

MIYAKE, Koji and ITO, Mitsuji. On lethal temperature of pure koji-diastase in aqueous solution and recovery of its action after heating. 177.

MIYAKE, Koji and NAKAMURA, Koji. On the effect of calcium oxide and calcium carbanate upon the decomposition of soy-bean cake and herring cake in two different soils. 27.

MIYAKE, Koji, NAKAMURA, Koji and SUGAWARA, Michitaro. On the nature of the absorption of ammonia by soils. 283.

MIYAKE, Koji and TAMACHI, Ishio. On the nature of the acidity appearing after the addition of soy-bean cake to a rice field. 305.

MIYAKE, Suguru. Chemical studies of corn pollen. II. Carbohydrates and organic bases. 167.

NAGAYAMA, Takeyoshi and YOKOTA, Toshiteru. Studies on phlorhizin glycosuria. I. Phlorhizin glycosuria and renal activity. 83.

NAKAMURA, Koji and MIYAKE, Koji. On

the effect of calcium oxide and calcium carbonate upon the decomposition of soy-bean cake and herring cake in two different soils. 27.

NAKAMURA, Koji, MIYAKE, Koji and SUGAWARA, Michitaro. On the nature of the absorption of ammonia by soils. 283.

NAKAYAMA, Mototaro. Über den normalen Wert der Zuckerausscheidungsschwelle. 407.

Nucleic acid, On the preparation of testes ——. 55.

ORGANIC bases, Chemical studies of corn pollen. II. Carbohydrates and ——. 174.

Oxidative acrivity, Studies on catalytic and ——. 211.

PHOSPHOLIPIN, Studies on physico-chemical properties of ——. 393.

Phlorhizin glycosuria, —— and renal activity. 83.

Preparation of testes nucleic acid, On the ——. 55.

RED blood corpuscles, Effect of various substances on the vitality of ——. 325.

Red corpuscles, The effect of the salt solution on the —— in blood. 461.

Renal activity, Phlorhizin glycosuria and ——. 83.

SALT, The effect of the —— solution on the red corpuscles in blood. 461.

Salz, Über den Einfluss des ——es und des Globulins auf das Agglutinationsphänomen. 423.

SHIONOYA, Takuji. Über den Einfluss des Salzes und des Globulins auf das Agglutinationsphänomen. 423.

Soils, On the effect of calcium oxide and calcium carbonate upon the decomposition of soy-bean cake and herring cake in two different ——. 27.

——, On the nature of the absorption of ammonia by ——. 195.

Soy-bean cake, On the effect of calcium oxide and calcium carbonate upon the decompostion of —— and herring cake in two different soils. 27.

Soy-bean, On the nature ef the acidity appearing after the addition of —— cake to a rice field. 305.

Spaltung der Stärke, Über die —— durch Amylase. I. 149.

Stärke, Über die Spaltung der —— durch Amylase. I. 149.

SUGAWARA, Michitaro, MIYAKE, Koji and NAKAMURA, Koji. On the nature of the absorption of ammonia by soils. 283.

Surface tension, On the dispersity and the —— of blood serum. 195.

TADOKORO, Tetsutaro. On the dispersity and the surface tension of blood serum. 195.

——, —— and Takahashi, Teizo. On the preparation of testes nucleic acid. 55.

TAKAHASHI, Teizo and TADOKORO, Tetsutaro. On the prepapration of testes nucleic acid. 55.

TAMACHI, Ishio and MIYAKE, Koji. On the nature of the acidity appearing after the addition of soy-bean cake to a rice field. 305.

UMEZAWA, Junichi, The effect of the salt solution on the red corpuscles in blood. 461.

Urinary calculus, Some analytical studies on the ——. 67.

YOKOTA, Toshiteru and NAGAYAMA, Takeyoshi. Studies on phorhizin glycosuria. I. Studies on phlorhizin glycosuria and renal activity. 83.

ZUCKERAUSSCHEIDUNGSSCHWELLE, Über den normalen Wert der ——. 407.

ANNOTATIONES
ZOOLOGICAE JAPONENSES

PUBLISHED BY

THE TOKYO ZOOLOGICAL SOCIETY,

COLLEGE OF SCIENCE, IMPERIAL UNIVERSITY OF TOKYO.

Subscription Price: $ 6.00 per volume

JOURNAL
OF
THE CHEMICAL SOCIETY
OF JAPAN

(JAPANESE)

PUBLISHED BY

THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN,

COLLEGE OF SCIENCE, IMPERIAL UNIVERSITY OF TOKYO.

Subscription Price: $ 4.00 per volume

ACTA PHYTOCHIMICA

PUBLISHED BY

THE IWATA INSTITUTE OF PLANT BIOCHEMISTRY.

Subscription Price: $ 5.00 per volume

(Remittance should be sent to Maruzen & Co. Ltd.,
14 Tori Sanchome, Nihonbashi, Tokyo)

外字生化學雜誌第參卷第參號
大正十三年四月二十七日印刷
大正十三年四月三十日發行

東京市牛込區市ヶ谷加賀町一丁目十一番地
編輯兼發行者　柿内三郎

東京市本郷區駒込林町百七十二番地
印刷者　柴山則常

東京市本郷區駒込林町百七十二番地
印刷所　合資會社　杏林舍

CONTENTS.

Page

MIYAKE, Koji, SUGAWARA, Michitaro and NAKAMURA, Koji. On the Nature of the Absorption of Ammonia by Soils............ 283

MIYAKE, Koji and TAMACHI, Ishio. On the Nnture of the Acidity Appearing after the Addition of Soybean Cake to a Rice Field. 305

KIKUCHI, Shinjiro. Effect of Various Substances on the Vitality of Red Blood Corpuscles.. 325

ETO, Itsuo. Beiträge zur Kenntnis des Gliadins.................. 373

FUJII, Nobuzo. Studies on Physico-chemical Properties of Phospholipin. II. The Effect of the Presence of Albumin on the Physico-chemical Properties of Lecithin.. 393

NAKAYAMA, Mototaro. Über den normalen Wert der Zuckerausscheidungsschwelle.. 407

SHIONOYA, Takuji. Über den Einfluss des Salzes und des Globulins auf des Agglutinationsphänomen.............................. 423

KAGEURA, Naomi. Über den Einfluss der Eiweissfettdiät anf den Kohlehydratstoffwechsel. V Mitteilung......................... 457

UMEZAWA, Junichi. The Effect of the Salt Solution on the Red Corpuscles in Blood.. 461

The Journal of Biochemistry is designed for the prompt publication of original investigations in biochemistry. It is issued quarterly. Each volume will contain about 500 pages. Contributions should be sent to the editor of *the Journal of Biochemistry*, the Institute of Medical Chemistry, Tokyo Imperial University, Tokyo. The papers should be limited to thirty printed pages, unless specially arranged. Authors receive 50 reprints of their papers free of charge; additional copies may be obtained at cost.

The subscription price is ¥10.00 per volume to subscribers in Nippon, payable in advance; $5.50 to those in other countries. Remittances should be made by draft or cheque on Tokyo, or by postal money order, payable to *The Journal of Biochemistry*, 11 Itchome Kagacho, Ushigome, Tokyo.

THE KYORINSHA PRESS